

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Σχολή Γεωπονικών Επιστημών

Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«Αειφόρος Αγροτική Παραγωγή και Διαχείριση Περιβάλλοντος»

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΦΥΤΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας σε παθογόνους μικροοργανισμούς σε φυτά
N. benthamiana που εκφράζουν ενδογενώς τη χαρπίνη HrpZ_{P_{sph}}



ΜΗΤΣΟΠΟΥΛΟΥ ΝΙΚΟΛΕΤΤΑ

Βόλος 2016

Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας σε παθογόνους μικροοργανισμούς σε φυτά *N. benthamiana*
που εκφράζουν ενδογενώς τη χαρπίνη HrpZ_{P_{sph}}

Νικολέττα Μητσοπούλου

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Παυλή Ουρανία, Λέκτορας, Γενετική Βελτίωση Φυτών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Χα Ιμπραχίμ, Αβραάμ, Καθηγητής, Γενετική Βελτίωση Φυτών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Βέλλιος Ευάγγελος, Επίκουρος Καθηγητής, Φυτοπαθολογία-Σύγχρονες Μέθοδοι
Διαγνωστικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Copyright © ΜΗΤΣΟΠΟΥΛΟΥ ΝΙΚΟΛΕΤΤΑ, 2016.

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας διατριβής, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναγράφεται η πηγή προέλευσης.

Η έγκριση της Μεταπτυχιακής Διατριβής Ειδίκευσης από το Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δε δηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.

Πρόλογος

Η παρούσα εργασία με τίτλο ‘Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας σε παθογόνους μικροοργανισμούς σε φυτά *N. benthamiana* που εκφράζουν ενδογενώς τη χαρπίνη HrpZ_{P_{sph}}’ αποτελεί την Μεταπτυχιακή μου Διατριβή, που κατατέθηκε στο Π.Μ.Σ. Αειφόρος Αγροτική Παραγωγή και Διαχείριση Περιβάλλοντος κατά το Ακαδημαϊκό έτος 2015-2016. Η εργασία αυτή εξετάζει την επαγωγή ανθεκτικότητας σε φυτά του είδους *Nicotiana benthamiana* που εκφράζουν τη χαρπίνη HrpZ_{P_{sph}}, προερχόμενη από το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* έπειτα από τεχνητή μόλυνση με το στέλεχος DC3000 του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* και τον ιό του μωσαϊκού του καπνού (*Tobacco mosaic virus*, TMV).

Η ολοκλήρωση της συγκεκριμένης Μεταπτυχιακής Διατριβής δεν θα ήταν εφικτή χωρίς την πολύτιμη βοήθεια ορισμένων ανθρώπων, τους οποίους και οφείλω να ευχαριστήσω. Αρχικά, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κα. Ουρανία Παυλή, Λέκτορα Γενετικής Βελτίωσης Φυτών, για την ανάθεση του θέματος, την καθοδήγησή της κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, της συγγραφής και της διόρθωσης.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους κ. Αβραάμ Χα, Καθηγητή Γενετικής Βελτίωσης Φυτών, και κ. Ευάγγελο Βέλλιο, Επίκουρο Καθηγητή Φυτοπαθολογίας, για τις χρήσιμες παρατηρήσεις και συμβουλές τους κατά τη διάρκεια της διόρθωσης. Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω θερμές ευχαριστίες στον κ. Δημήτριο Τσιτσιγιάννη, Επίκουρο Καθηγητή Φυτοπαθολογίας (Γ.Π.Α.) για τη χορήγηση των βακτηριακού και ιικού μολύσματος που αξιοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή.

Κλείνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Χρυσάνθη Φώτη, υποψήφια διδάκτορα Γενετικής Βελτίωσης Φυτών, για τη βοήθειά της κατά τη διάρκεια των πειραμάτων στο εργαστήριο Γενετικής Βελτίωσης Φυτών.

Περίληψη

Είναι ευρέως γνωστό ότι οι βακτηριακής προέλευσης χαρπίνες, κατά την εξωγενή εφαρμογή τους ή την ενδογενή έκφρασή τους σε φυτά, επάγουν μηχανισμούς άμυνας, προσδίδοντας ανθεκτικότητα σε βιοτικούς ή/και αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης. Σε προηγούμενες μελέτες, έχει αποδειχθεί ότι η χαρπίνη HrpZ_{Psph}, που προέρχεται από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, προσδίδει ανθεκτικότητα στον ιό *Beet necrotic yellow vein virus* που προκαλεί την ασθένεια της ριζομανίας των ζαχαροτεύτλων. Ειδικότερα, η ενδογενής έκφραση της χαρπίνης HrpZ_{Psph} στην εκκρινόμενη μορφή της (SP/HrpZ_{Psph}), ώστε να κατευθύνεται η συσσώρευση της πρωτεΐνης εξωκυτταρικά, αποδείχθηκε ότι προσδίδει ανθεκτικότητα στη ριζομανία τόσο σε διαγονιδιακά φυτά του είδους *Nicotiana benthamiana* όσο και σε διαγονιδιακές ρίζες ζαχαρότευτλου. Στα πλαίσια αυτά, στόχο της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής αποτέλεσε η διερεύνηση πιθανούς ανάπτυξης ευρείας ανθεκτικότητας στα διαγονιδιακά φυτά του είδους *N. benthamiana* που εκφράζουν την πρωτεΐνη SP/HrpZ_{Psph}. Για το σκοπό αυτό, αρχικά πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση των διαθέσιμων διαγονιδιακών σειρών προκειμένου να προσδιοριστεί η ομοζύγωτη/ετεροζύγωτη κατάσταση του διαγονιδίου SP/hrpZ_{Psph} σε φυτά T₂ γενιάς και ακολούθησε η ανάπτυξη αποκλειστικά ομοζύγωτων διαγονιδιακών φυτών T₃ γενιάς. Η ενσωμάτωση και η έκφραση του διαγονιδίου SP/hrpZ_{Psph} επιβεβαιώθηκε με PCR και RT-PCR αντίστοιχα σε όλα τα T₃ φυτά που εξετάστηκαν. Ωστόσο, οι υπό μελέτη διαγονιδιακές σειρές χαρακτηρίζονταν από διαφορετικά επίπεδα έκφρασης του διαγονιδίου. Προκειμένου να διερευνηθεί εάν η ενδογενής παραγωγή της SP/HrpZ_{Psph} επάγει αμυντικούς μηχανισμούς, εξετάστηκε η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών, με τη χρήση της αντίδρασης RT-PCR. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων *hin1*, *SIPK*, *WIPK* και *hsr203J*, τα οποία σχετίζονται με την αντίδραση υπερευαισθησίας (Hypersensitive response, HR), καθώς και των γονιδίων *AOX*, *CoII*, *NPRI* και *PR1a*, τα οποία εμπλέκονται στη σύνθεση ενεργών μορφών οξυγόνου (AOS), ιασμονικού οξέος (JA), σαλικυλικού οξέος (SA) και πρωτεϊνών παθογένεσης (PR), αντίστοιχα. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας έναντι του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC3000) και του ιού του μωσαϊκού του καπνού (*Tobacco mosaic virus*, TMV). Αρχικά πραγματοποιήθηκαν μολύνσεις με τα παθογόνα που προαναφέρθηκαν και ακολούθησε η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας, τόσο σε μακροσκοπικό επίπεδο όσο με μεθόδους ποσοτικοποίησης του παθογόνου. Στα πειράματα ανθεκτικότητας συμπεριλήφθηκαν και φυτά αγρίου τύπου, ως θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες για την εξασφάλιση της αξιοπιστίας των

αποτελεσμάτων. Τα προκαταρκτικά αποτελέσματα των πειραμάτων υποδεικνύουν ότι η εξωκυτταρική έκφραση της SP/HrpZ_{P_{sph}} δύναται να προσδώσει ευρεία ανθεκτικότητα και παράλληλα, υπογραμμίζουν τη δυνατότητα αξιοποίησης των χαρπινών ως μια εναλλακτική προσέγγιση για τη βελτίωση της ανθεκτικότητας των φυτών, μέσω της χρήσης γενετικής μηχανικής.

Λέξεις κλειδιά: γενετική μηχανική, φυτό μοντέλο, βελτίωση για ανθεκτικότητα, βιοτικές καταπονήσεις, ευρεία ανθεκτικότητα

Summary

It is well established that the bacterial harpin proteins, upon external application or endogenous expression in plants, are capable of inducing defense mechanisms, thus conferring resistance against various biotic and/or abiotic stress factors. Previous studies have shown that harpin HrpZ_{P_{sph}}, originating from the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, confers resistance against *Beet necrotic yellow vein virus*, the causal agent of rhizomania disease of sugar beets. More specifically, the endogenous expression of harpin HrpZ_{P_{sph}} in its secretable form (SP/HrpZ_{P_{sph}}), to direct protein accumulation in the plant apoplast, has proven capable of inducing rhizomania resistance both in transgenic *Nicotiana benthamiana* plants and transgenic sugar beet roots. In this framework, the aim of the present dissertation is the investigation of possible acquisition of broad-range resistance in transgenic *N. benthamiana* plants, due to the expression of SP/HrpZ_{P_{sph}} protein. For this purpose, the available T₂ transgenic lines were initially assessed in order to determine their homozygous/heterozygous condition and subsequently, homozygous for the transgene plants were selfed and their progeny were grown (T₃). The presence, as well as the expression of the transgene *SP/hrpZ_{P_{sph}}* was confirmed, by means of PCR and RT-PCR assays, in all T₃ plants tested. However, transgenic lines under study were characterized by different expression levels of the transgene *SP/hrpZ_{P_{sph}}*. In order to examine whether the endogenous production of SP/HrpZ_{P_{sph}} leads to the induction of defense mechanisms, the expression of various genes which are associated with plants' defense was tested by means of RT-PCR assays. In this line, we studied the expression of *hin1*, *SIPK*, *WIPK* and *hsr203J*, which are related with the hypersensitivity response (HR), and *AOX*, *CoII*, *NPR1* and *PR1a*, which are involved in biosynthesis of reactive oxygen species (AOS), jasmonic acid (JA), salicylic acid (SA) and pathogenesis-related proteins (PR), respectively. Finally, the resistance of plants against the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC3000) and the *Tobacco mosaic virus* (TMV) was assessed by challenge-inoculation experiments and subsequent evaluation of resistance on the basis of symptom development and pathogen quantification. In all assays, wild type plants were included both as positive and negative controls in order to increase experimental robustness. The preliminary results suggest that the extracellular expression of SP/HrpZ_{P_{sph}} is capable of inducing broad-range resistance and moreover, highlight the possibility to employ harpins as an alternative breeding approach for generating resistance in plants, through the use of genetic engineering.

Keywords: genetic engineering, model plant, resistance breeding, biotic stresses, broad-range resistance

Εγώ η Νικολέττα Μητσοπούλου είμαι ο συγγραφέας αυτής της Μ.Δ.Ε. Αυτή η Μ.Δ.Ε. αντικατοπτρίζει την έρευνα που έγινε από εμένα και δεν έχει υποβληθεί (εξ ολοκλήρου ή μέρος της) σαν προπτυχιακή διατριβή ή Μ.Δ.Ε. ή ως μέρος Διδακτορικής Διατριβής σε αυτό ή άλλο Προπτυχιακό ή Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών Ιδρυμάτων Τριτοβάθμιας Εκπαίδευσης του εσωτερικού ή εξωτερικού. Όποια συνεργασία καθώς και το μέγεθος αυτής δηλώνονται επακριβώς στο αντίστοιχο πεδίο αυτής της διατριβής. Επίσης έχω διαβάσει όλες τις βιβλιογραφικές αναφορές που παρατίθενται στο τέλος.



Ως επιβλέπουσα της έρευνας που περιγράφεται σε αυτή τη διατριβή, δηλώνω ότι όλοι οι όροι του Εσωτερικού Κανονισμού του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος έχουν τηρηθεί από την κα. Νικολέττα Μητσοπούλου.



Πίνακας περιεχομένων

1. Εισαγωγή.....	1
1.1 Μηχανισμοί Άμυνας των Φυτών.....	1
1.2 Αντίδραση Υπερευαίσθησίας (Hypersensitive Response, HR).....	2
1.3 Βιοχημικά Μονοπάτια που Προσδίδουν Ανθεκτικότητα στα Φυτά.....	4
1.3.1 Το Μονοπάτι Βιοσύνθεσης Σαλικυλικού Οξέος.....	4
1.3.2 Το Μονοπάτι Βιοσύνθεσης Ιασημονικού Οξέος.....	5
1.3.3 Το Μονοπάτι Βιοσύνθεσης Αιθυλενίου.....	7
1.3.4 Το Μονοπάτι Βιοσύνθεσης Αμπισισικού Οξέος.....	7
1.4 Εκκριτικό Σύστημα Τύπου III.....	9
1.5 Χαρπίνες.....	12
1.6 Το είδος <i>Nicotiana benthamiana</i>	15
1.7 Σκοπός της Εργασίας.....	19
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	20
2.1 Φυτικό Υλικό.....	20
2.2 Αξιολόγηση των Διαγονιδιακών Φυτών.....	21
2.2.1 Επιλογή των Διαγονιδιακών Σειρών.....	21
2.2.2 Έλεγχος για την Ένθεση του Διαγονιδίου <i>SP/hrpZ_{P_{sph}}</i>	22
2.2.3 Έλεγχος για την Έκφραση του Διαγονιδίου.....	24
2.2.4 Έλεγχος της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται σε βιοχημικά μονοπάτια άμυνας των φυτών.....	26
2.3 Μόλυνση των διαγονιδιακών φυτών (T ₃) και αξιολόγηση της ανθεκτικότητας... ..	28
3. Αποτελέσματα.....	32
3.1 Επιλογή και Ανάπτυξη Διαγονιδιακών Φυτών.....	32
3.2 Αξιολόγηση των Διαγονιδιακών Φυτών.....	35
3.2.1 Έλεγχος της παρουσίας του διαγονιδίου <i>SP/hrpZ_{P_{sph}}</i>	35
3.2.2 Έλεγχος της έκφρασης του διαγονιδίου <i>SP/hrpZ_{P_{sph}}</i>	35
3.2.3 Έλεγχος της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται σε βιοχημικά μονοπάτια άμυνας των φυτών	36
3.3 Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας των φυτών που εκφράζουν το γονίδιο <i>SP/hrpZ_{P_{sph}}</i>	38
3.3.1 Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας στον ιό του μωσαϊκού του καπνού (<i>Tobacco mosaic virus</i> , TMV).....	38

3.3.2 Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας στο βακτήριο <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	42
4. Συζήτηση.....	45
5. Συμπεράσματα.....	56
6. Βιβλιογραφία.....	58

Κατάλογος Συντομογραφιών

ABA: Absciscic acid, αμπισισικό οξύ

AOS: Active Oxygen Species, Ενεργές ρίζες οξυγόνου

avr: avirulence, αμολυσματικότητα

BNYVV: *Beet necrotic yellow vein virus*, Ιός της ριζομανίας των ζαχαρότευτλων

bp: base pairs, ζεύγη βάσεων

cDNA: complementary DNA, συμπληρωματικό DNA

DAS-ELISA: Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

dNTPs: deoxy-nucleotides triphosphates, τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια

DTT: dithiothreitol, διθειοτριθειόλη

ET: Ethylene, αιθυλένιο

HIN1 gene: harpin-induced gene

HCD: Hypersensitive cell death

HR: Hypersensitive response, αντίδραση υπερευαισθησίας

Hrc: hypersensitive response and conserved

Hrp: hypersensitive response and pathogenity

Hrp_{EA}: harpin *Erwinia amylovora*

HrpN: harpin N

hrpZ: harpin Z gene

HrpZ_{PspH}: harpin Z *Pseudomonas syingae* pv. *phaseolicola*

HrpZ_{Pss}: harpin Z *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

INA: 2,6-διχλωροισονικotinικό οξύ

JA: Jasmonate acid, ιασμονικό οξύ

JAZ: Jasmonate ZIM domain

LB: Luria-Bertani (LB) broth

Mbp: Mega base pairs

MS: Murashige and Skoog

mRNA: messenger RNA

NAA: 1-naphthaleneacetic acid

ND: Nanodrop

NO: nitrogen monoxide, μονοξείδιο του αζώτου

PR: Pathogen-Related

PEG: Polyethylene Glycol, πολυαιθυλενική γλυκόλη

OD: Optical Density, Οπτική Πυκνότητα

PCR: Polymerase Chain Reaction

POD: peroxidase, υπεροξειδάση

PPO: Polyphenol Oxidase, πολυφαινολική οξειδάση

PR: pathogenesis-related

PVX: *Potato virus X*

RNase: ribonuclease

RT-PCR: Real Time Polymerase Chain Reaction

SA: Salicylic Acid, Σαλικυλικό Οξύ

SAR: Systemic Acquired Resistance, διασυστηματική επίκτητη ανθεκτικότητα

SP/hrpZ_{PspH}: Secreted Protein harpin Z, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

TAE: Tris-acetate-EDTA

TTSS: Type Three Secretion System, Εκκριτικό Σύστημα Τύπου III

TMV: *Tobacco mosaic virus*, Ιός του μωσαϊκού του καπνού

TrypPI: trypsin protease inhibitor

virG: virulence gene *G*

WT: Wild type plants, φυτά αγρίου τύπου

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 2.1: Τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του διαγονιδίου <i>hrpZ_{P_{sph}}</i> και της περιοχής <i>virG</i> του <i>A. tumefaciens</i> καθώς και οι αλληλουχίες τους.....	23
Πίνακας 2.2: Πρωτόκολλο αντιδράσεων ενίσχυσης PCR.....	23
Πίνακας 2.3: Πρωτόκολλο αντιδράσεων ενίσχυσης RT-PCR.....	26
Πίνακας 2.4: Ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των υπό μελέτη γονιδίων.....	27
Πίνακας 2.5: Πρωτόκολλο αντιδράσεων ενίσχυσης RT-PCR για τη μελέτη της έκφρασης γονιδίων σχετιζόμενα με βιοχημικά μονοπάτια άμυνας των φυτών.....	28
Πίνακας 3.1: Αριθμός διαγονιδιακών φυτών T ₃ γενιάς και φυτών-μαρτύρων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας.....	34
Πίνακας 3.2: Μέσοι όροι των τιμών DAS-ELISA σε πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας έναντι του ιού του μωσαϊκού του καπνού (<i>Tobacco mosaic virus</i> , TMV). Τα δεδομένα αφορούν σε μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας στα 405nm, 10 και 20 ημέρες (ημμ) μετά τη μηχανική μόλυνση με τον ιό.....	41

Κατάλογος Εικόνων-Σχημάτων

Εικόνα 1.1: Σχηματική αναπαράσταση του εκκριτικού συστήματος III φυτοπαθογόνων βακτηρίων. Η συσκευή έκκρισης γεφυρώνει και τις δύο βακτηριακές μεμβράνες και είναι συνδεδεμένη με μια κυτοπλασματική ΑΤΡαση. Το εκκριτικό σύστημα τύπου III των φυτοπαθογόνων βακτηρίων βρίσκεται ενωμένο με μια εξωκυτταρική κεραία βακτηρίου που ενδεχομένως συνδέεται με το κυτταρικό τοίχωμα του φυτού. IM: Εσωτερική Μεμβράνη, OM: Εξωτερική Μεμβράνη, PM: Πρωτοπλασματική Μεμβράνη (Πηγή: Büttner and He, 2009)...11	
Εικόνα 1.2: Σχηματική απεικόνιση του ρόλου των χαρπινών στα φυτά (Πηγή: Pavli et al., 2008).....13	
Εικόνα 1.3: Μέθοδος παροδικής έκφρασης διαγονιδίων, μέσω αγροεμποτισμού, σε φύλλα του είδους <i>Nicotiana benthamiana</i> (Πηγή: http://biology.fullerton.edu/msacco/Research.html)...17	
Εικόνα 1.4: Διερεύνηση της λειτουργίας ενός γονιδίου X ικής προέλευσης ως πιθανού καταστολέα της γονιδιακής σίγησης (RNA silencing suppressor). Διαγονιδιακά φυτά όπου έχει σιγηθεί η έκφραση της πρωτεΐνης GFP (GFP-silenced plant) εμποτίζονται με βακτηριακά κύτταρα τα οποία εκφράζουν το υπό μελέτη γονίδιο X. Κατόπιν έκθεσης σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV), είναι δυνατή η ταυτοποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν καταστολείς της γονιδιακής σίγησης. Η ύπαρξη καταστολέα ταυτοποιείται μέσω του φθορίζοντα φαινοτύπου.....17	
Σχήμα 2.1: Απεικόνιση της γονιδιακής κατασκευής που χρησιμοποιήθηκε για το γενετικό μετασχηματισμό φυτών του είδους <i>N. benthamiana</i> . Η υπό μεταφορά περιοχή περιείχε το γονίδιο <i>hrpZ</i> , που προέρχεται από το φυτοπαθογόνο βακτήριο <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> NPS3121 (μεγέθους 995 bp), ως προϊόν σύντηξης με το πεπτίδιο έκκρισης PR1 καθώς και το γονίδιο <i>aphIV</i> (hygromycin B phosphotransferase) που προσδίδει ανθεκτικότητα στην υγρομυκίνη.....20	
Εικόνα 2.2: Συσκευή Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer.....25	
Εικόνα 2.3: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου ενζυμικής ανοσοανίχνευσης DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).....30	
Εικόνα. 3.1: Επιλογή σπόρων T ₂ γενιάς του είδους <i>Nicotiana benthamiana</i> σε θρεπτικό μέσο επιλογής που περιέχει υγρομυκίνη (30 mg/l). Α, Β, Γ. Διαγονιδιακά φυτά T ₂ γενιάς που	

εκφράζουν ενδογενώς την πρωτεΐνη SP/HrpZ_{P_{sph}} (**A, B**: ομοζύγωτες σειρές, **Γ**: ετεροζύγωτη σειρά), **Δ**. Νεαρά φυτάρια άγριου τύπου (wt) που δεν αναπτύσσονται υπό την πίεση επιλογής. Η ανθεκτικότητα στην υδρομυκίνη επιβεβαιώνει τη διαγονιδιακή φύση των T₂ σειρών.....32

Εικόνα 3.2: Αναγεννημένα φυτά σε στάδιο σκληραγώγησης και εγκλιματισμού. **A**. Μεταφορά νεαρού φυτού σε χώμα, **B**. Κάλυψη φυτών ιστοκαλλιέργειας με σακούλες, **Γ**. Σταδιακή αφαίρεση της κάλυψης προς εγκλιματισμό των φυτών σε συνθήκες περιβάλλοντος.....33

Εικόνα. 3.3: Επίδραση της ενδογενούς έκφρασης της χαρπίνης SP/HrpZ_{P_{sph}} στην ανάπτυξη των φυτών του είδους *N. benthamiana*. **A**. Μη-μετασχηματισμένο φυτό (άγριου τύπου). **B**. Διαγονιδιακό φυτό ίδιας ηλικίας που εκφράζει την πρωτεΐνη SP/HrpZ_{P_{sph}}.....34

Εικόνα. 3.4: Προϊόντα ενίσχυσης πολλαπλής PCR σε μετασχηματισμένα φυτά του είδους *N. benthamiana*. M: Marker (bp) (Gene Ruler Ladder mix, Fermentas). 1,2,3: Μετασχηματισμένα φυτά (T₃ γενιά) που φέρουν το διαγονίδιο SP/hrpZ_{P_{sph}} (995 bp). 4: Βακτηριακά κύτταρα (*A. tumefaciens*, C58C1) μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο pBin.Tx.Hyg-SP/HrpZ_{P_{sph}}. 5: Μη-μετασχηματισμένο φυτό. Το προϊόν ενίσχυσης (590 bp) που αντιστοιχεί στο γονίδιο *virG* του *A. tumefaciens* ανιχνεύθηκε μόνο στα βακτηριακά κύτταρα, υποδεικνύοντας την απουσία αλληλουχιών του Ti πλασμιδίου.....35

Εικόνα. 3.5: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων αντίστροφης μεταγραφής ακολουθούμενης από PCR (RT-PCR). 1-6: ενίσχυση του διαγονιδίου *hrpZ* (995 bp) σε διαγονιδιακά φυτά που έχουν μετασχηματιστεί με το πλασμίδιο pBin.Hyg.Tx-SP/hrpZ_{P_{sph}}. Ladder: Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas).....36

Εικόνα 3.6: Επαγωγή της έκφρασης γονιδίων άμυνας σε διαγονιδιακά φυτά του είδους *N. benthamiana* που εκφράζουν τη χαρπίνη SP/hrpZ_{P_{sph}} συγκριτικά με φυτά άγριου τύπου. **A.-Θ**. M: Δείκτης σε bp (Gene Ruler Ladder mix, Fermentas). 1,2,3: Φυτά μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο pBin.Hyg.Tx-SP/hrpZ_{P_{sph}}. Παρατηρείται έκφραση των γονιδίων *AOX*, *Col1*, *NPR1*, *SIPK*, *WIPK*, *hsr203j*, *PR1a* και *hin1*, που αντιστοιχούν σε αμπλικόνια μεγέθους 160, 228, 273, 755, 1158, 596, 335, 847 bp αντίστοιχα. 4: Μη διαγονιδιακό φυτό. Παρατηρείται έκφραση των γονιδίων *AOX*, *Col1*, *NPR1*, *SIPK*, *WIPK*, *hsr203j* και *PR1a*, ενώ το γονίδιο

hin1 δεν εκφράζεται. **I. M:** Δείκτης σε bp (Gene Ruler Ladder mix, Fermentas). 1,2,3: Φυτά που εκφράζουν το γονίδιο *SP/hrpZ_{P_{sph}}*. Παρατηρείται έκφραση του γονιδίου *EF1a* (669 bp). 4: Γονιδιωματικό DNA που χρησιμοποιείται ως πρότυπο με σκοπό να αναδείξει πιθανή μόλυνση με γονιδιωματικό DNA. Λόγω της παρουσίας ιντρονίου, το αμπλικόνιο που αντιστοιχεί στο γονίδιο *EF1a* είναι μεγαλύτερου μεγέθους σε σύγκριση με το μεταγραφόμενο τμήμα που παράχθηκε από την RT-PCR.....37

Εικόνα 3.7: Συμπτώματα του ιού του μωσαϊκού του καπνού σε φυτά αγρίου τύπου του είδους *N. benthamiana*. **A.** Φυτό με ήπια συμπτώματα μαρασμού, χλώρωσης και συστροφής των φύλλων (10 ημέρες μετά τη μόλυνση με τον ιό) **B.** Φυτό με συμπτώματα γενικευμένου μαρασμού και συστροφής των φύλλων (10 ημέρες μετά τη μόλυνση με τον ιό) **Γ.** Φυτό με συμπτώματα εκτεταμένης χλώρωσης (20 ημέρες μετά τη μόλυνση με τον ιό).....39

Εικόνα 3.8: Συμπτώματα του ιού του μωσαϊκού του καπνού (*Tobacco mosaic virus*, TMV) σε διαγονιδιακά φυτά του είδους *N. benthamiana* που εκφράζουν το γονίδιο *SP/hrpZ_{P_{sph}}*. **A.** Φυτό με ήπια συμπτώματα χλώρωσης των φύλλων (10 ημέρες μετά τη μόλυνση με τον ιό) **B.** Φυτό με συμπτώματα χλώρωσης και συστροφής στα κατώτερα φύλλα (20 ημέρες μετά τη μόλυνση με τον ιό) **Γ, Δ.** Συμπτώματα χλώρωσης των φύλλων.....40

Εικόνα 3.9: Φυτά αγρίου τύπου και διαγονιδιακά φυτά του είδους *N. benthamiana* που εκφράζουν το γονίδιο *SP/hrpZ_{P_{sph}}* με συμπτώματα του ιού του μωσαϊκού του καπνού (20 ημέρες μετά τη μόλυνση με τον ιό). **A.** Φυτά αγρίου τύπου με συμπτώματα χλώρωσης, συστροφής και νέκρωσης των φύλλων **B.** Διαγονιδιακά φυτά με ήπια συμπτώματα χλώρωσης και νέκρωσης των φύλλων.....41

Εικόνα 3.10: Συμπτώματα της βακτηριακής κηλίδωσης, 4 ημέρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC3000) σε φυτά αγρίου τύπου του είδους *N. benthamiana*. **A.** Φυτό με συμπτώματα χλωρωτικών κηλίδων **B.** Φυτό με εμφανείς χλωρωτικές κηλίδες οι οποίες περιβάλλονται από χλωρωτική άλω **Γ. Δ.** Συμπτώματα χλώρωσης και χλωρωτικών κηλίδων.....42

Εικόνα 3.11: Συμπτώματα της βακτηριακής κηλίδωσης, 4 ημέρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC3000) σε διαγονιδιακά φυτά του είδους *N.*

benthamiana που εκφράζουν το γονίδιο *SP/hrpZ_{P_{sph}}* **A.** Διαγονιδιακά φυτά με συμπτώματα χλώρωσης των φύλλων **B.** Διαγονιδιακά φυτά με ήπια συμπτώματα χλωρωτικών κηλίδων **Γ.** Διαγονιδιακό φυτό με συμπτώματα χλωρωτικών και νεκρωτικών κηλίδων **Δ.** Φύλλο με συμπτώματα νεκρωτικής κηλίδας ως αποτέλεσμα επαγωγής της αντίδρασης υπερευαισθησίας (Hypersensitive response, HR).....43

1. Εισαγωγή

Τα φυτά, σε αντίθεση με τα ζώα, εξαιτίας του γεγονότος ότι είναι ακίνητοι οργανισμοί στη φύση, δεν έχουν το πλεονέκτημα αποφυγής του παράγοντα καταπόνησής τους -παθογόνος οργανισμός ή αβιοτική καταπόνηση- μέσω της φυγής. Συνεπώς, η αποτελεσματική αποφυγή ή/και αντιμετώπιση του παράγοντα καταπόνησής τους επιτυγχάνεται είτε μέσω της χρήσης φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων είτε μέσω της επαγωγής εξειδικευμένων μηχανισμών άμυνας, οι οποίοι έχουν αναπτυχθεί ως αποτέλεσμα της εξέλιξής τους υπό τη δράση της φυσικής επιλογής. Οι μηχανισμοί αυτοί αποσκοπούν αρχικά στην αντίληψη της πηγής του ερεθίσματος που δέχονται και στη συνέχεια, στη μεταγωγή του σήματος που έχει ως αποτέλεσμα την άμεση ή έμμεση επαγωγή βιοχημικών μονοπατιών άμυνας.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η αλληλεπίδραση ενός παθογόνου οργανισμού με το φυτό ξενιστή είναι μια αρκετά σύνθετη διαδικασία, η οποία, ανάλογα με το συνδυασμό των αλληλεπιδρώντων οργανισμών, μπορεί να καταλήξει στην εκδήλωση ασθένειας στην περίπτωση φυτών ξενιστών, στην αμοιβαία απόκλισή τους στην περίπτωση φυτών που δε συνιστούν ξενιστές ή ακόμη και στην εδραίωση συμβιωτικής σχέσης (Tampakaki, 2014). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν βακτήρια των γενών *Azospirillum* και *Rhizobium*, τα οποία έχει βρεθεί πως προάγουν την ανάπτυξη των φυτών, καθώς και τα βακτήρια των γενών *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* και *Streptomyces*, τα οποία έχουν θετική επίδραση στην υγεία των φυτών (Berg, 2009).

1.1 Μηχανισμοί Άμυνας των Φυτών

Οι μηχανισμοί άμυνας των φυτών βασίζονται κατά κανόνα στην έμφυτη ανοσία του κάθε κυττάρου τους, καθώς επίσης και σε σήματα που προέρχονται από τα σημεία των μολύνσεων (Jones and Dangl, 2006). Το σύστημα ανοσίας των φυτών χαρακτηρίζεται από μεγάλη πλαστικότητα όσον αφορά την ικανότητά του να αναγνωρίζει και να αποκρίνεται στους παθογόνους μικροοργανισμούς, ενώ έχουν αναγνωριστεί διάφορα επίπεδα άμυνας του συστήματος αυτού (Hofius et al., 2007).

Οι μηχανισμοί άμυνας των φυτών διακρίνονται σε δομικούς ή προϋπάρχοντες και σε επαγόμενους μηχανισμούς. Οι δομικοί ή προϋπάρχοντες μηχανισμοί σχετίζονται με την ύπαρξη κηρών, το πάχος της εφυμενίδας, της ενδοδερμίδας και του κυτταρικού τοιχώματος, τη λειτουργία και κατασκευή των στοματίων, των νευρώσεων των φύλλων και των

επιφανειακών τριχιδίων, καθώς επίσης και την ενδεχόμενη παρουσία θρεπτικών συστατικών, τοξικών μεταβολιτών και παρεμποδιστών ενζύμων (Τζάμος, 2007, σελ 383-385). Ωστόσο, οι επαγόμενοι μηχανισμοί άμυνας είναι αυτοί που ίσως έχουν περισσότερο ενδιαφέρον, καθώς χρησιμοποιούνται όταν τα φυτά βρίσκονται σε κατάσταση άμεσου κινδύνου. Αυτοί με τη σειρά τους σχετίζονται με την ενίσχυση του κυτταρικού τοιχώματος μέσω της εναπόθεσης λιγνίνης, καλόξης ή/και άλλων πρωτεϊνών, τη δημιουργία στρωμάτων φελλών, τη δημιουργία τυλώσεων ή θηλίδων, καθώς επίσης και με τη βιοσύνθεση φυτοαλεξινών, την παραγωγή οξειδωτικών και υδρολυτικών ενζύμων και τη σύνθεση ενεργών μορφών οξυγόνου.

Είναι αξιοσημείωτο βέβαια το γεγονός ότι, πέραν της γονοτυπικής εξάρτησης, η απόκριση των φυτών στα ερεθίσματα που δέχονται παρουσιάζει και χρονική εξάρτηση, με αποτέλεσμα το στάδιο ανάπτυξης του φυτού να σχετίζεται άμεσα με την καταπόνηση στην οποία υπόκειται. Έτσι, φυτά που είναι ευαίσθητα σε μια δεδομένη καταπόνηση κατά τη διάρκεια ενός σταδίου ανάπτυξης, ενδέχεται να παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε άλλα στάδια ανάπτυξής τους. Επίσης, οι περιβαλλοντικές συνθήκες συντελούν στην ανθεκτικότητα ή την ευπάθεια ενός φυτού σε ένα παθογόνο.

Η επαγωγή μερικών ή όλων των παραπάνω μηχανισμών άμυνας παρατηρείται στις περισσότερες αλληλεπιδράσεις που οδηγούν σε εκδήλωση ανθεκτικότητας, που συνήθως, αλλά όχι πάντα, συνοδεύεται από την αντίδραση υπερευαισθησίας (Hypersensitive Response, HR) (Ταμπακάκη, 1999, σελ 19). Πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι οι μηχανισμοί αυτοί λειτουργούν στα ανθεκτικά κατά περίπτωση φυτά ή παραμένουν σε λανθάνουσα κατάσταση και διεγείρονται από βιοτικούς ή αβιοτικούς παράγοντες (Τζάμος, 2007, σελ. 398).

1.2 Αντίδραση Υπερευαισθησίας (Hypersensitive response, HR)

Ο Stakman το 1915 όρισε ως Αντίδραση Υπερευαισθησίας – ΑΥ (Hypersensitive Response-HR) την ταχύτατη νέκρωση κυττάρων σε ποικιλίες σιτηρών, ανθεκτικών στους μύκητες που προκαλούν σκωριάσεις (Τζάμος, 2007, σελ. 395) Η αντίδραση υπερευαισθησίας είναι ουσιαστικά ένας ταχύς θάνατος τόσο των κυττάρων του φυτού που γειτνιάζουν με το σημείο εισβολής του παθογόνου, όσο και του παθογόνου οργανισμού (Hofius et al., 2007).

Η αντίδραση αυτή συνοδεύεται από την παραγωγή φαινολικών ουσιών και αντιμικροβιακών παραγόντων (Hueck, 1998) και έχει ως αποτέλεσμα την πρόληψη δημιουργίας αποικιών,

πολλαπλασιασμού και απορρόφησης θρεπτικών στοιχείων του παθογόνου από το φυτό ξενιστή. Θα μπορούσε να ειπωθεί πως η αντίδραση υπερευαισθησίας είναι ένας προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος του φυτού, εμφανής σε μακροσκοπικό επίπεδο, που έχει αρκετές ομοιότητες με το φαινόμενο της απόπτωσης στα θηλαστικά, αν και δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως τα βιοχημικά μονοπάτια των δύο φαινομένων. Ωστόσο, αναφέρεται ότι τα φυτοπαθογόνα βακτήρια, και όχι τα σαπροφυτικά συγγενικά είδη τους, έχουν την ικανότητα να προκαλούν μια τέτοιου είδους αντίδραση στο φυτό ξενιστή τους (Tampakaki et al., 2010), γεγονός που υποδεικνύει μια ακόμη πιο εξειδικευμένη αλληλεπίδραση των δύο οργανισμών.

Η αντίδραση υπερευαισθησίας (Hypersensitive response, HR) του φυτού ενδέχεται να συνοδεύεται από μια διασυστηματική αντίδραση, που ονομάζεται διασυστηματική επίκτητη ανθεκτικότητα (Systemic Acquired Resistance, SAR) και η οποία μπορεί να είναι αποτελεσματική ως προς ένα ευρύ φάσμα παθογόνων, όπως μύκητες, βακτήρια και ιοί, που προκαλούν νεκρώσεις. Μάλιστα η ανθεκτικότητα αυτή μπορεί να έχει την ίδια εξίσου επίδραση στον παθογόνο οργανισμό όταν προκαλείται από χημικές ουσίες που εφαρμόζονται εξωγενώς στα φυτά, όπως το σαλικυλικό οξύ (SA) και το 2,6-διχλωροισονικοτινικό οξύ (INA) (Strobel et al., 1996).

Η αντίδραση υπερευαισθησίας διεγείρεται από το παθογόνο ή από ουσίες του παθογόνου που ονομάζονται διεγέρτες (elicitors). Οι διεγέρτες αυτοί βρίσκονται πάνω ή κοντά στην επιφάνεια του παθογόνου που προκαλεί την αντίδραση υπερευαισθησίας, και μπορεί να είναι γενικοί, όπως φλατζελίνη, λιποπολυσακχαρίτες, πεπτιδογλυκάνη, χιτίνες, πρωτεΐνες, κ.α. (Hofius et al., 2007) ή εξειδικευμένοι ως προς τη φυλή του παθογόνου, όπως ελιστινίνες, χαρπίνες και γονίδια αμολυσματικότητας (*avr*) (Τζάμος, 2007, σελ 415, 416).

Η ταχύτητα με την οποία ενεργοποιείται η αντίδραση υπερευαισθησίας διαφέρει ανάλογα με το παθογόνο και τη φυτική επιφάνεια, αλλά είναι σίγουρα μεγαλύτερη (δηλαδή η αντίδραση υπερευαισθησίας μπορεί να διαρκεί λίγα λεπτά της ώρας) από την ταχύτητα ανάπτυξης μιας τυπικής εικόνας συμπτωμάτων ασθένειας. Πριν την έναρξη της αντίδρασης υπερευαισθησίας, παρατηρείται διαρροή ηλεκτρολυτών από τα φυτικά κύτταρα, διακοπή της φυσιολογικής ανταλλαγής ιόντων K^+ / H^+ , εισροή ιόντων Ca^{+2} , παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου και συσσώρευση φυτοαλεξινών. Στη συνέχεια, το πρώτο στάδιο της αντίδρασης αυτής περιλαμβάνει την αναγνώριση του παθογόνου από το φυτό, μέσω γονιδίων αμολυσματικότητας του παθογόνου και γονιδίων ανθεκτικότητας του φυτού (Pontier et al.,

1998). Έπειτα, παρεμβαίνουν διάφορα μονοπάτια μεταγωγής σημάτων που οδηγούν σε αλλαγές στη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών, στην παραγωγή ενεργού οξυγόνου και στις ροές σιδήρου.

1.3 Βιοχημικά Μονοπάτια που Προσδίδουν Ανθεκτικότητα στα Φυτά

Τα κύρια γνωστά βιοχημικά μονοπάτια που εμπλέκονται στη μεταφορά του σήματος για την ενεργοποίηση της άμυνας του φυτού έναντι κάποιου παθογόνου, προσδίδοντας ανθεκτικότητα στα φυτά ξενιστές, αφορούν στη βιοσύνθεση του σαλικυλικού οξέος, του ιασημονικού οξέος, του αιθυλενίου και του αμπισισικού οξέος.

1.3.1 Το μονοπάτι Βιοσύνθεσης Σαλικυλικού Οξέος

Το σαλικυλικό οξύ (salicylic acid, SA) είναι μια ένωση που κατατάσσεται στην κατηγορία των φαινολών. Η ένωση αυτή προσφέρει σημαντικές θεραπευτικές, αντισηπτικές και αναλγητικές ιδιότητες στον άνθρωπο. Στα φυτά είναι δυνατό να συντίθεται μέσω δύο χωριστών βιοχημικών μονοπατιών: αυτού των φαινυλοπροπανοειδών, το οποίο προέρχεται από τη φαινυλαλανίνη, και αυτού του ισοχωρισμικού που πραγματοποιείται στους χλωροπλάστες (Rivas-San Vicente and Plasencia, 2011). Το σαλικυλικό οξύ μπορεί να μετακινηθεί ταχέως από το σημείο της αρχικής εφαρμογής ή συνθέσεώς του σε απομακρυσμένους φυτικούς ιστούς (Τζάμος, 2007, σελ 404).

Η εν λόγω φαινόλη έχει ποικίλες ιδιότητες στα φυτά. Συγκεκριμένα, συνδέεται με την επαγωγή της ανθογένεσης σε φυτά μακράς ημέρας (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010, σελ 764), τη βλαστικότητα των σπόρων, τη φωτοσυνθετική διαδικασία, τη διαπνοή, την ανάπτυξη, τη γήρανση, την προστασία του φυτού λόγω οξειδωτικών καταπονήσεων (Rivas-San Vicente and Plasencia, 2011), την αντίδραση του φυτού σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις, το σχηματισμό του άνθους, καθώς και μια μορφή κυτταρικού θανάτου, η οποία δεν σχετίζεται με την αντίδραση υπερευαισθησίας.

Πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι το σαλικυλικό οξύ ρυθμίζει τα συστατικά του δικού του βιοχημικού μονοπατιού, και επιπλέον εμπλέκεται στην ανταλλαγή σημάτων (cross-talk) με άλλα βιοχημικά μονοπάτια που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα φυτά (War et al., 2011),

καθώς επίσης και ότι επηρεάζει την ανάπτυξη των φυτών υπό συνθήκες καταπόνησης λόγω απορρόφησης θρεπτικών στοιχείων, υδατικών σχέσεων, ρύθμισης της δραστηριότητας των στομάτων και φωτοσύνθεσης (Hayat et al., 2010).

Μάλιστα έχει βρεθεί ότι η εξωτερική εφαρμογή (ψεκασμός) σαλικυλικού οξέος συγκέντρωσης 1,5 mM σε φυτά ρεβιθιού, ήταν ασφαλής για τα φυτά και είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας της υπεροξειδάσης (peroxidase, POD) και της οξειδάσης της πολυφαινόλης (polyphenol oxidase, PPO) καθώς και την επαγωγή μεγαλύτερης συσσώρευσης ολικών φαινολικών, H_2O_2 , και πρωτεϊνών (War et al., 2011). Πρέπει επίσης να αναφερθεί, ότι η εφαρμογή σαλικυλικού οξέος στα φυτά προάγει την αντοχή σε αβιοτικές καταπονήσεις όπως σε υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων, ακατάλληλες θερμοκρασίες (υψηλές και χαμηλές), έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, καθώς και στην ξηρασία (Hayat et al., 2010). Ακόμη, η εξωγενής εφαρμογή της ουσίας αυτής στα φύλλα των φυτών *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, σε συγκέντρωση 10^{-5} βρέθηκε πως μειώνει τα καταστρεπτικά αποτελέσματα της υψηλής συγκέντρωσης αλάτων στην αύξηση των φυτών και πως επιταχύνει την αναχαίτιση της διαδικασίας της αύξησης (Idrees et al., 2011).

Στο σύνολό τους, τα ευρήματα αυτά παρέχουν σημαντικές ενδείξεις ότι η εξωγενής εφαρμογή σαλικυλικού οξέος, σε μη-τοξικά για τα φυτά επίπεδα, δρα ως διεγέρτης του αμυντικού συστήματος των φυτών και συνεπώς, προσδίδει ανθεκτικότητα σε βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης.

1.3.2 Το μονοπάτι Βιοσύνθεσης Ιασμονικού Οξέος

Το ιασμονικό οξύ (jasmonate acid, JA), όπως και ο μεθυλιωμένος εστέρας του (methyl jasmonate), παράγονται από το λινολενικό οξύ, δηλαδή από τα λιπαρά οξέα. Τόσο το ιασμονικό οξύ όσο και το μεθυλιωμένο ιασμονικό οξύ υπάρχουν σε όλα τα φυτά και μπορούν να μετακινούνται εύκολα στην υγρή και στην αέρια φάση τους (Τζάμος, 2007, σελ 405). Όπως και στην περίπτωση του σαλικυλικού οξέος, το ιασμονικό οξύ παίζει σημαντικό ρόλο σε ποικίλες διεργασίες των φυτών. Ειδικότερα, αποτελεί κύριο ρυθμιστή ανάπτυξης που ελέγχει διεργασίες όπως η ωρίμανση των στημόνων, η αύξηση της ρίζας, η συσσώρευση ανθοκυανίνης, η γήρανση των φύλλων (Yan and Daoxin, 2015), καθώς επίσης και η ανάπτυξη των καρπών, των ανθέων, των σπερμάτων, η ζωτικότητα της γύρης, η δημιουργία

κονδύλων και η εκβλάστηση σπερμάτων που βρίσκονται σε λήθαργο (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010, σελ 763).

Αναφέρεται ότι το ιασμονικό οξύ, πέραν των άλλων διεργασιών που ελέγχει, καθορίζει επίσης την αντίσταση των φυτών έναντι παθογόνων οργανισμών μέσω σύνθετων βιοχημικών μονοπατιών, στα οποία εμπλέκονται και άλλες ουσίες όπως το σαλικυλικό οξύ, το αιθυλένιο και το μονοξειδίο του αζώτου (Yan and Daoxin, 2015). Όσον αφορά τους νεκροτροφικούς μύκητες (π.χ. *Alternaria brassicicola*, *Fusarium oxysprum*, *Botrytis cinerea*, κ.α.) καθώς και τα έντομα, όπως οι αφίδες του είδους *Myzus persicae*, το ιασμονικό οξύ προσδίδει ανθεκτικότητα στα φυτά-ξενιστές.

Ωστόσο έρευνες που αφορούν στην επίδραση του ιασμονικού οξέος στην άμυνα των φυτών έναντι νηματωδών, οι οποίες παρέχουν αντιφατικά αποτελέσματα, καθώς η συγκεκριμένη ουσία σχετίζεται τόσο με επαγωγή ανθεκτικότητας, όσο και με ενίσχυση της ευπάθειας. Συγκεκριμένα, η εξωγενής εφαρμογή μεθυλιωμένου ιασμονικού οξέος προκάλεσε ανθεκτικότητα έναντι των κομβωδών νηματωδών σε φυτά τομάτας και ρυζιού (Cooper et al., 2005; Nahar et al., 2011). Το θετικό ρόλο του ιασμονικού οξέος στην ενίσχυση της ανθεκτικότητας έναντι νηματωδών καταδεικνύουν και τα αποτελέσματα της έρευνας των Sun et al. (2010) όπου η μεταλλαγή (*spr2*) που ευθύνεται για την αδυναμία βιοσύνθεσης JA, επέφερε αυξημένη ευπάθεια της τομάτας στους νηματώδεις.

Αντίθετα, η μεταλλαγή *jai1*, που σχετίζεται με παρεμβολή στο σηματοδοτικό μονοπάτι του ιασμονικού οξέος, οδήγησε σε μειωμένη ευπάθεια της τομάτας έναντι των νηματωδών, υποδεικνύοντας ότι η ακεραιότητα του εν λόγω σηματοδοτικού μονοπατιού αποτελεί προϋπόθεση για την ευπάθεια στους νηματώδεις (Bhattarai et al., 2008; Fan et al., 2014). Παρόμοια αποτελέσματα αυξημένης ευπάθειας προέκυψαν και από πειράματα στο είδος *Arabidopsis*, όπου η μεταλλαγή *lox4* που προάγει τη βιοσύνθεση JA, φάνηκε να σχετίζεται με ενίσχυση της ευαισθησίας τόσο στους κομβώδεις όσο και στους κυστώδεις νηματώδεις (Ozalvo et al., 2014; Yan and Daoxin, 2015).

Συνολικά, τα αποτελέσματα από τις μέχρι τώρα μελέτες υπογραμμίζουν το διττό ρόλο του JA στην εκδήλωση της ανθεκτικότητας/ευαισθησίας, ενώ ταυτόχρονα συνηγορούν στην πολύπλευρη δράση του JA και των εμπλεκόμενων σηματοδοτικών μονοπατιών στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτών και νηματωδών (Yan and Daoxin, 2015). Τέλος, έχει βρεθεί ότι το βιοχημικό μονοπάτι του ιασμονικού οξέος, μέσω της εφαρμογής μεθυλιωμένου

ιασμονικού οξέος σε φυτά αραβίδωσης, προκαλεί αλλαγές στους πληθυσμούς κοινοτήτων βακτηρίων που ζουν στο έδαφος (Carvalhais et al., 2013).

1.3.3 Το Μονοπάτι Βιοσύνθεσης Αιθυλενίου

Το αιθυλένιο (ethylene, ET) είναι μια πτητική φυτορρυθμιστική ουσία, η οποία παίζει καίριο ρόλο τόσο στην ανάπτυξη και γήρανση των φυτών, όσο και στην επαγωγή της αντίδρασης υπερευαισθησίας (Hypersensitive response, HR) στην περίπτωση προσβολής των φυτών από κάποιο παθογόνο. Από χημική άποψη, πρόκειται για έναν υδρογονάνθρακα, που συντίθεται από το αμινοξύ μεθειονίνη, μέσω δύο ενδιάμεσων μεταβολικών προϊόντων (αδενοσυλομεθειονίνη και αμινο-κυκλοπροπανο-καρβοξυλικό οξύ) (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010, σελ.740). Η συγκεκριμένη ουσία έχει βρεθεί πως συνδέεται με διάφορες διεργασίες των φυτών, όπως η ωρίμανση καρπών, η πτώση των φύλλων, η γήρανση φύλλων και ανθέων, η πλευρική επέκταση των κυττάρων στους βλαστούς των χερσαίων φυτών και η επιμήκυνση κυττάρων στα βυθισμένα στο νερό φυτά (Μανέτας, 2005, σελ 249).

Όσον αφορά τη διαδικασία πρόκλησης ανθεκτικότητας στα φυτά, η παρουσία του αιθυλενίου προκαλεί δομικές αλλαγές που αυξάνουν την αντοχή του κυτταρικού τοιχώματος, π.χ. εναπόθεση λιγνίνης (Τζάμος, 2007, σελ 406). Ωστόσο, ο ρόλος του στις αλληλεπιδράσεις φυτού-παθογόνου είναι πιο σύνθετος, μιας και επάγει ανθεκτικότητα έναντι ορισμένων παθογόνων και ευαισθησία έναντι άλλων (Tampakaki et al., 2009, σελ 666). Πρέπει επίσης να σημειωθεί, πως το αιθυλένιο και το ιασμονικό οξύ είναι συνδεδεμένα με την επαγωγή ανθεκτικότητας έναντι νεκροτροφικών παθογόνων, σε αντίθεση με το σαλικυλικό οξύ, το οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα έναντι βιοτροφικών παθογόνων (Fan et al., 2009). Τέλος, έχει βρεθεί ότι σε φυτά αραβίδωσης τα οποία μολύνθηκαν από τεχνητούς παράγοντες πρόκλησης ασθένειας (*vad1-1*), τα γονίδια για τη σύνθεση αιθυλενίου ενεργοποιήθηκαν μόνο κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες τεχνητής πρόκλησης ασθένειας (Bouchez et al., 2007).

1.3.4 Το Μονοπάτι Βιοσύνθεσης Αμπισισικού Οξέος

Το αμπισισικό οξύ (abscisic acid, ABA) είναι μια φυτορρυθμιστική ένωση, που κατατάσσεται στην ομάδα των σεσκιτερπενοειδών, η οποία έχει βρεθεί πως λειτουργεί ποικιλοτρόπως στα φυτά. Η ένωση αυτή περιέχει 15 άτομα άνθρακα και συναντάται σε όλα τα ανώτερα φυτά, σε

μερικά είδη μυκήτων, χλωροφυκών και βρυοφύτων, στον εγκέφαλο των θηλαστικών, καθώς και σε ζύμες και βακτήρια (Ζιώγας και Μάρκογλου, σελ.737).

Η βιοσύνθεση του αμπισισικού οξέος αν και αρχίζει από το μεταβαλονικό οξύ, στη συνέχεια μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω δύο βιοχημικών μονοπατιών: αυτό του πυροφωσφορικού φαρνεσυλίου και αυτό της ξανθοξίνης, η οποία με τη σειρά της μετατρέπεται σε αλδεύδη του αμπισισικού οξέος. Πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι το αμπισισικό οξύ συντίθεται στη ρίζα συνεχώς και κινείται ανοδικά προς τα φύλλα, μέσω του ξυλώματος. Εντός των φύλλων, καταλήγει στα κύτταρα του μεσοφύλλου, όπου αποικοδομείται και απενεργοποιείται.

Ο ρόλος του στα φυτά φαίνεται πως σχετίζεται με διάφορες λειτουργίες, όπως για παράδειγμα το κλείσιμο των στομάτων υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης, τη γήρανση των φύλλων, το φύτρωμα των σπερμάτων (Μανέτας, 2005, σελ. 150, 249), τη διακοπή της μεταφοράς φωτοσυνθετικών προϊόντων στα φυτικά όργανα, καθώς και τη ρύθμιση των επιπέδων RNAs που κωδικοποιούν αποθησαυριστικές πρωτεΐνες που χρησιμεύουν στη βλάστηση των σπόρων (Ζιώγας και Μάρκογλου, σελ. 739).

Η επίδραση του αμπισισικού οξέος στην επαγωγή ανθεκτικότητας των φυτών έναντι διαφόρων παθογόνων, αλλά και η σχέση της ένωσης αυτής με τις προαναφερθείσες ουσίες (σαλικυλικό οξύ, ιασμονικό οξύ, αιθυλένιο) που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα φυτά έχει ερευνηθεί εκτενώς. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι η εξωγενής εφαρμογή αμπισισικού οξέος σε φυτά ρυζιού, προάγει την ανθεκτικότητα των φυτών έναντι του μύκητα *Cochliobolus miyabeanus*, και ότι αυτή βασίζεται στην αναχαίτιση του μύκητα στο στρώμα του μεσοφύλλου. Επίσης, η επαγόμενη ανθεκτικότητα δεν προέρχεται από μηχανισμούς που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα από το σαλικυλικό οξύ, το ιασμονικό οξύ και το σχηματισμό καλλόζης, αλλά απαιτεί την ύπαρξη μιας λειτουργικής Ga πρωτεΐνης (De Vleeschauwer et al., 2010). Σε άλλη έρευνα (Achuo, et al., 2006), βρέθηκε ότι η υδατική καταπόνηση σε φυτά τομάτας είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του ενδογενούς αμπισισικού οξέος και την καταστολή των μολύνσεων από τους μύκητες *Oidium neolycopersici* και *Botrytis cinerea*. Αντίθετα, η υψηλή συγκέντρωση αλάτων προκάλεσε σημαντική μείωση στη μόλυνση από το μύκητα *Oidium neolycopersici*, χωρίς ωστόσο να επηρεάσει τη μόλυνση από το μύκητα *Botrytis cinerea* και τα επίπεδα του ενδογενούς αμπισισικού οξέος. Ακόμη, η εξωγενής εφαρμογή αμπισισικού οξέος είχε ως αποτέλεσμα αυξημένη ευπάθεια έναντι και των δύο παθογόνων, αλλά όταν η παρεχόμενη ποσότητα υπερέβαινε τα βασικά επίπεδα που συνθέτουν τα φυτά, δεν αύξανε την ευπάθεια στα παραπάνω παθογόνα.

Επιπρόσθετα, υπό συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης αλάτων βρέθηκε ότι τα επίπεδα αμπισισικού οξέος ήταν αυξημένα, γεγονός που αποδεικνύει ότι στις περιπτώσεις περιβαλλοντικών καταπονήσεων ενεργοποιείται η παραγωγή σήματος (ABA-mediated signalling) που οδηγεί στην καταστολή της διασυστηματικής επίκτητης ανθεκτικότητας (SAR) (Yasuda et al., 2008).

Όσον αφορά στην επίδραση της συσσώρευσής του στη βιοσύνθεση άλλων ουσιών που επάγουν ανθεκτικότητα στα φυτά, έχει βρεθεί (Fan et al., 2009) πως το αμπισισικό οξύ προάγει τη συσσώρευση του ιασμονικού οξέος, ενώ η αλληλεπίδραση του με το σαλικυλικό οξύ κατά τη διάρκεια ανάπτυξης ασθένειας, παρουσιάζεται ως πιο σύνθετη. Επιπρόσθετα, η εξωγενής εφαρμογή ή ενδογενής συσσώρευσή του σε φυτά αραβίδωσης προκάλεσε αυξημένη ανάπτυξη του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, ωστόσο μείωσε την ευπάθεια των φυτών έναντι του μύκητα *Alternaria brassicicola*.

Σύμφωνα με τους Seo and Park (2010), ο παράγοντας μεταγραφής *MYB96* σε φυτά αραβίδωσης συνδέει τα σήματα που εκπέμπονται από το αμπισισικό οξύ λόγω αβιοτικών καταπονήσεων με τη βιοσύνθεση σαλικυλικού οξέος και την αντίδραση των φυτών στην προσβολή από παθογόνα, γεγονός που υποδεικνύει τη θετική αλληλεπίδραση των δύο ουσιών έναντι τόσο αβιοτικών όσο και βιοτικών καταπονήσεων. Ωστόσο, οι Mauch-Mani and Mauch (2005), αναφέρουν ότι το αμπισισικό οξύ είναι γενικά ένας αρνητικός ρυθμιστής της επαγωγής ανθεκτικότητας των φυτών, και μάλιστα η εξωγενής εφαρμογή αμπισισικού οξέος σχετίζεται με αυξημένη ευπάθεια σε παθογόνα. Το φαινόμενο αυτό προκαλείται από την ανάμιξη του αμπισισικού οξέος στη διαδικασία παραγωγής σημάτων από το σαλικυλικό οξύ, το ιασμονικό οξύ και το αιθυλένιο λόγω βιοτικών καταπονήσεων.

Εν κατακλείδι, το γεγονός ότι οι αντιδράσεις των φυτών στις βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις είναι γενικά ανταγωνιστικές, υποδεικνύει ότι η ακριβής ρύθμιση σε αυτές τις αντιδράσεις είναι ζωτικής σημασίας για τα φυτά (Hoffman, 2008).

1.4 Εκκριτικό Σύστημα Τύπου III

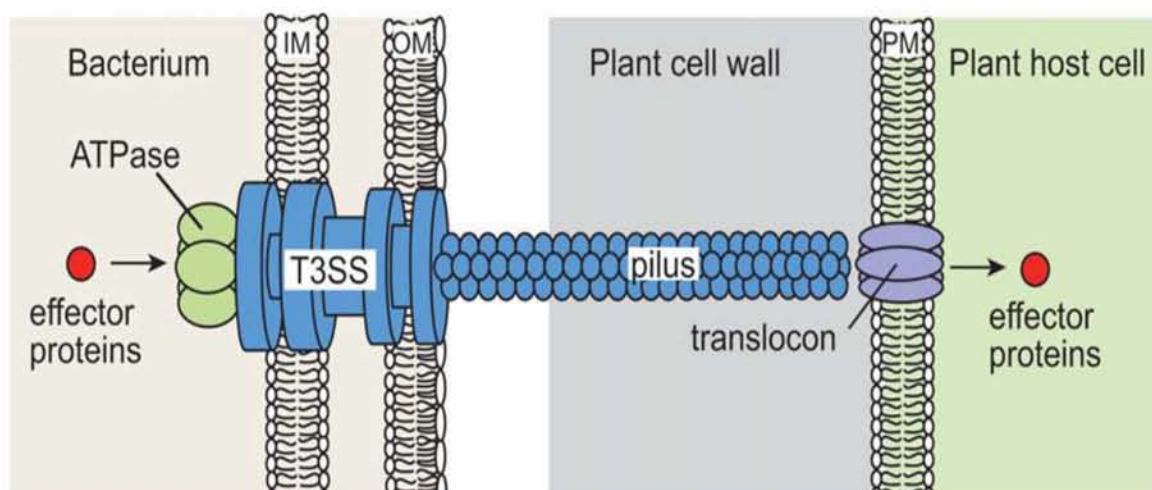
Χαρακτηριστική ιδιότητα των βακτηρίων αποτελεί η κατοχή διαφόρων μονοπατιών έκκρισης πρωτεϊνών και άλλων παραγόντων παθογένειας στο περιβάλλον ή εντός των κυττάρων των ευκαρυωτικών οργανισμών. Τα μονοπάτια αυτά ονομάζονται τύπου I, II, III, IV, V, και VI,

και παρά το γεγονός ότι παρουσιάζουν ομοιότητες, διαφέρουν ως προς τη θέση έκκρισης της πρωτεΐνης. Ειδικότερα, εντοπίζονται διαφορές στις περιπτώσεις όπου η πρωτεΐνη εκκρίνεται στην εσωτερική κυτοπλασματική μεμβράνη ή στην εξωτερική μεμβράνη που περιέχει λιποπολυσακχαρίτες (Saier, 2006). Θα πρέπει να αναφερθεί ότι οι παράγοντες παθογένειας των βακτηρίων (π.χ. γονίδια) αποτελούν τμήματα συγκεκριμένων περιοχών του βακτηριακού χρωμοσώματος, που ονομάζονται *pathogenicity islands*, τα οποία βοηθούν στη μετάβαση των παραγόντων αυτών κατά μη συνεχή τρόπο (quantum leap) (Collmer et al., 2000).

Το εκκριτικό σύστημα τύπου III (Type III secretion system, TTSS) απαντάται στα Gram-αρνητικά βακτήρια και ευθύνεται για την έκκριση και τη μεταφορά πρωτεϊνών απευθείας από το βακτηριακό στο ευκαρυωτικό κυτταρόπλασμα. Το TTSS συναντάται τόσο σε βακτηριακά παθογόνα ζώων (π.χ. *Yersinia-Yops*) όσο και σε βακτηριακά παθογόνα φυτών και είναι μια πρωτεϊνική δομή, που συνίσταται από 20-25 πρωτεΐνες, και εδράζεται στο βακτηριακό κυτταρικό φάκελο. Στα φυτοπαθογόνα βακτήρια το TTSS σχετίζεται με την παθογένεια και κωδικοποιείται από τη γονιδιακή νησίδα *hrp/hrc* (*hrp*: HR and pathogenicity *hrc*: HR and conserved) (Bogdanove, et al., 1996; Alfano and Collmer, 1997). Το συγκεκριμένο εκκριτικό σύστημα όμως, δεν έχει ταυτοποιηθεί στο βακτήριο *Agrobacterium* (Li, 2007, pp 21).

Θα πρέπει να αναφερθεί, ότι το εκκριτικό αυτό σύστημα επάγεται μετά από επαφή των βακτηρίων με τα κύτταρα-ξενιστές και η μεταφορά των πρωτεϊνών στα ευκαρυωτικά κύτταρα πραγματοποιείται μέσω των θέσεων επαφής των βακτηρίων με τα κύτταρα ξενιστές (Ταμπακάκη, 1999, σελ. 48). Για να πραγματοποιηθεί η μεταφορά των παραγόντων παθογένειας, το σύστημα αυτό πρέπει να διαπεράσει πολλαπλά φυσικά εμπόδια, τα οποία είναι δύο βακτηριακές μεμβράνες που χωρίζονται από ένα στρώμα πεπτιδογλυκάνης, και η πρωτοπλασματική μεμβράνη του φυτικού κυττάρου που καλύπτεται από το κυτταρικό τοίχωμα (Büttner and He, 2009) (Εικόνα 1.1).

Παρά το γεγονός ότι το σύστημα αυτό είναι όμοιο μόνο ως προς την κατασκευή του για όλα τα γένη των βακτηρίων, οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες διαφέρουν σημαντικά, γεγονός που αντανακλάται στο μεγάλο εύρος ασθενειών που μπορεί ένα βακτήριο να προκαλέσει σε διαφορετικούς ξενιστές (Hueck, 1998). Πρέπει να σημειωθεί πως κάποιοι τύποι του εν λόγω συστήματος έχουν τη δυνατότητα να ενεργούν σαν υποδερμικές βελόνες, οι οποίες εκκρίνουν πρωτεΐνες κατευθείαν στο κυτταρόπλασμα των φυτικών κυττάρων, χωρίς αυτές να εκτίθενται στο εξωτερικό περιβάλλον (Saier, 2006).



Εικόνα 1.1: Σχηματική αναπαράσταση του εκκριτικού συστήματος ΙΙΙ φυτοπαθογόνων βακτηρίων. Η συσκευή έκκρισης γεφυρώνει και τις δύο βακτηριακές μεμβράνες και είναι συνδεδεμένη με μια κυτοπλασματική ΑΤΡαση. Το εκκριτικό σύστημα τύπου ΙΙΙ των φυτοπαθογόνων βακτηρίων βρίσκεται ενωμένο με μια εξωκυτταρική κεραία βακτηρίου που ενδεχομένως συνδέεται με το κυτταρικό τοίχωμα του φυτού. IM: Εσωτερική Μεμβράνη, OM: Εξωτερική Μεμβράνη, PM: Πρωτοπλασματική Μεμβράνη (Πηγή: Büttner and He, 2009).

Το TTSS κωδικοποιείται από *hrp* (*hypersensitive response and pathogenity genes*) γονίδια, τα οποία χαρακτηρίζονται από την ιδιότητά τους να προκαλούν μόλυνση στα ευαίσθητα φυτά και αντίδραση υπερευαισθησίας στα φυτά-μη ξενιστές και σε ανθεκτικές ποικιλίες των φυτών-ξενιστών (Büttner and He, 2009). Όσον αφορά τα επιμέρους τμήματά του, αποτελείται από ένα σύνθετο προεκβάλλον σωματίδιο (injectisome), το οποίο περιέχει πάνω από 20 πρωτεΐνες, καθώς και από ένα σύνθετο δίκτυο ειδικών συνοδών (chaperones) που στοχεύουν σε πρωτεΐνες έκκρισης στην αντίθετη πλευρά του προεκβάλλοντος σωματιδίου (antechamber of the injectisome) (Portaliou et al., 2016). Το εν λόγω σωματίδιο παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες, ως προς την κατασκευή και τις συστατικές πρωτεΐνες, με το βακτηριακό μαστίγιο (Erhardt et al., 2010).

Το σωματίδιο αυτό είναι μια κατασκευή που ομοιάζει με νανο-σύριγγα, συνδέει μια ευκαρυωτική και δύο βακτηριακές μεμβράνες και απαρτίζεται από τρία επιμέρους τμήματα: το εξωκυτταρικό τμήμα (θεωρείται η γέφυρα μεταξύ του βακτηριακού και του φυτικού κυττάρου), το βασικό σώμα και τα διάφορα συστατικά της εσωτερικής μεμβράνης (σύμπλοκο ΑΤΡάσης και κυτοπλασματικός δακτύλιος) και έχει το ρόλο της μεταφοράς των πρωτεϊνών-τελεστών στο κυτταρόπλασμα του φυτικού κυττάρου. Το εξωκυτταρικό τμήμα, είναι στην πραγματικότητα η κεραία του βακτηρίου (Hrp pilus) και η σημαντικότητά του έγκειται στο

ότι αποτελεί μια δίοδο μεταφοράς των πρωτεϊνών-τελεστών στο φυτικό κύτταρο. Η κεραία αυτή είναι μεγαλύτερη στην περίπτωση φυτοπαθογόνων βακτηρίων, πιθανόν λόγω του ότι τα βακτήρια αυτά πρέπει να διαπεράσουν το παχύ κυτταρικό τοίχωμα ώστε να εισέλθουν στο κυτταρόπλασμα των φυτικών κυττάρων (Büttner and He, 2009).

1.5 Χαρπίνες

Οι χαρπίνες είναι μία κατηγορία πρωτεϊνών που συνιστούν το εκκριτικό σύστημα τύπου III των φυτοπαθογόνων βακτηρίων, το οποίο εξυπηρετεί στην έκκριση πρωτεϊνών-τελεστών στο εσωτερικό των κυττάρων-ξενιστών. Το πρώτο γένος βακτηρίου στο οποίο εντοπίστηκαν οι χαρπίνες ήταν το *Erwinia* spp. που είχε στην κατοχή του τις χαρπίνες HrpN και HrpW. Εκτός όμως από αυτό το γένος, έχουν βρεθεί και στα *Pseudomonas* spp. (HrpZ1, HrpW1, HrpAK1), *Ralstonia* spp. (PopA1), *Xanthomonas* spp. (HpaGe, Hpa1, XopA), *Acidovorax*, *Burkholderia* και *Pantoea* (Wei et al., 1992; He et al., 1993; Li et al., 2010; Tampakaki et al., 2010).

Παρά τις διαφορές τους σε αμινοξικό επίπεδο, οι προερχόμενες από διαφορετικά είδη χαρπίνες παρουσιάζουν ομοιότητες που έγκεινται στο ότι είναι υδρόφιλες, θερμοσταθερές, πλούσιες σε γλυκίνες, χωρίς κυστείνες και εκκρίνονται σε μέσο καλλιέργειας των βακτηρίων. Είναι επίσης όξινες, εκκρίνονται σε θρεπτικό μέσο όταν εκφράζεται το σύστημα Hrp (Li, 2007, pp.31) και είναι ευαίσθητες στην πρωτεάση.

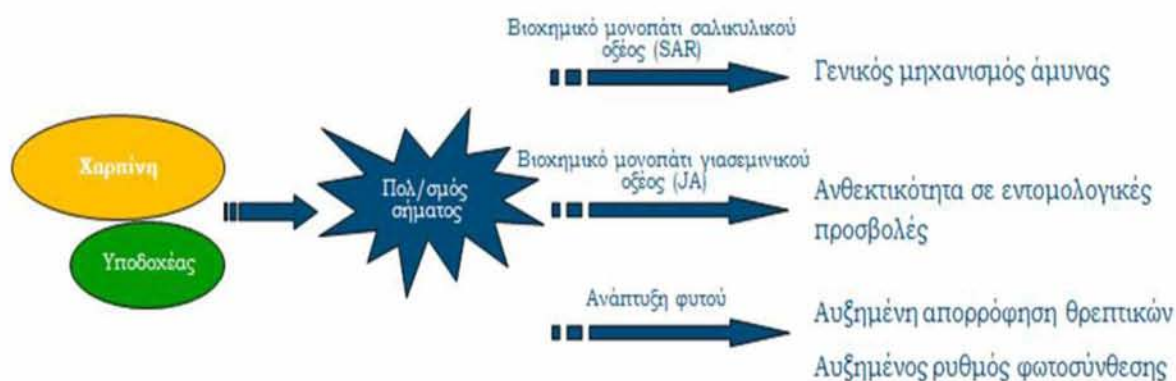
Οι χαρπίνες κάποιων ειδών βακτηρίων μιμούνται τη λειτουργία των ορμονών των φυτών. Συγκεκριμένα, οι εν λόγω πρωτεΐνες του βακτηρίου *P. syringae* έχουν την ικανότητα να μιμούνται το ιασμονικό οξύ, συνεπώς να προκαλούν άνοιγμα των στομάτων και να διευκολύνουν την είσοδο του παθογόνου στον αποπλάστη των φυτικών κυττάρων (Jones and Dangl, 2006).

Χαρακτηριστική είναι η ιδιότητα των χαρπινών να προκαλούν γρήγορη κυτταρική νέκρωση κατά την έγχυσή τους στον αποπλάστη των φυτών (Ταμπακάκη, 1999, σελ 55). Ωστόσο κάθε είδος χαρπίνης διακρίνεται από διαφορετική ικανότητα επαγωγής της αντίδρασης υπερευαισθησίας (Hypersensitive response, HR). Η εξωγενής εφαρμογή τους στα φυτά καθώς και η ενδογενής έκφρασή τους διαμέσου σταθερού ή παροδικού μετασχηματισμού, προκαλούν μια σειρά αντιδράσεων σε κυτταρικό/μοριακό επίπεδο που συνδέονται με τις λειτουργίες άμυνας των φυτών, τοπικά ή διασυστηματικά, αποδίδοντας ανθεκτικότητα σε μια

πλειάδα παθογόνων (Strobel et al., 1996; Dong et al., 1999; Peng et al., 2003), καθώς και αβιοτικών παραγόντων, όπως η αντοχή στην ξηρασία (Dong et al., 2005; Tampakaki et al., 2010).

Ωστόσο, ο ρόλος των χαρπινών δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Αναφέρεται ότι οι χαρπίνες επάγουν την ανθεκτικότητα των φυτών μέσω μιας διαδικασίας σηματοδότησης που ξεκινά ανάντη του σαλικυλικού οξέος και καταλήγει στην ενεργοποίηση των *PR* γονιδίων (Dong et al., 1999). Αξίζει ακόμη να σημειωθεί πως οι χαρπίνες (ή αλλιώς πρωτεΐνες τελεστές) ενός παθογόνου θα ήταν αναποτελεσματικές έναντι ενός ξενιστή που εξελικτικά αποκλίνει από τους ήδη υπάρχοντες, καταλήγοντας σε αποτυχία της ανάπτυξης του παθογόνου. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την παράλληλη και ανεξάρτητη εξέλιξη των φυτών-ξενιστών και των παθογόνων οργανισμών (Jones and Dangl, 2006).

Πέραν της επαγωγής αμυντικών μηχανισμών, οι χαρπίνες επηρεάζουν και την αναπτυξιακή βιολογία των φυτών αυξάνοντας κυρίως το ρυθμό ανάπτυξης, την ευρωστία, την απορρόφηση θρεπτικών στοιχείων και τη φωτοσύνθεση (Kim and Beer, 2000; Oh and Beer, 2007; Pavli et al., 2011) (Εικόνα 1.2). Αποτέλεσμα των ανωτέρω είναι η βελτίωση της φυτρωτικότητας, η προαγωγή της ανάπτυξης του ριζικού συστήματος και του υπέργειου μέρους του φυτού και τελικά, η αυξημένη και περισσότερο ποιοτική παραγωγή. Θα πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι οι χαρπίνες έχει βρεθεί πως επηρεάζουν και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτών, για παράδειγμα μειώνοντας τον αριθμό των κυττάρων του καμβίου, ή μειώνοντας το μέγεθος των επιδερμικών κυττάρων (Jang et al., 2006).



Εικόνα 1.2: Σχηματική απεικόνιση του ρόλου των χαρπινών στα φυτά (Πηγή: Pavli et al., 2008).

Η παραγωγή των χαρπινών υπόκειται στη ρύθμιση των γονιδίων *hrp*, τα οποία δεν είναι όμοια για τα διαφορετικά γένη παθογόνων οργανισμών (Li, 2007, pp.31), γεγονός που αντανακλάται και στο φαινότυπο των φυτών. Στα γονίδια *hrp* διακρίνονται δύο κατηγορίες, οι οποίες βασίζονται σε διαφορές στο γονιδίωμα των βακτηρίων, για παράδειγμα το περιεχόμενο των γονιδίων, η τοποθέτηση αυτών και η ρύθμιση της μεταγραφής τους. Η πρώτη κατηγορία *hrp/hrc1* περιλαμβάνει βακτήρια των γενών *Pseudomonas* (π.χ. *P.s. pv phaseolicola* 1448A, *P.s.pv syringae* 642) και *Erwinia* (π.χ. *E. amylovora* ATCC 49946), ενώ η κατηγορία *hrp/hrc2* περιλαμβάνει βακτήρια των γενών *Xanthomonas* (π.χ. *X.oryzae* pv. *oryzae*, *X. citri*), *Ralstonia*, *Acidovorax*, και *Burkholderia* (Tampakaki, 2014).

Τα γονίδια *hrp* συναντώνται σε γονιδιακές νησίδες, οι οποίες περιέχουν περίπου 25 γονίδια που εντοπίζονται στα χρωμοσώματα (Alfano and Collmer, 1997). Μάλιστα, τα *hrp* γονίδια των παθότυπων του βακτηρίου *P. syringae* ομαδοποιούνται σε μια απλή χρωματοσωμική περιοχή μεγέθους 25kb που περιέχει έως και 27 γονίδια, τα οποία ομαδοποιούνται σε 7 οπερόνια (Li, 2007, pp. 27). Παρά το γεγονός ότι στα φυτά δεν είναι γνωστή η ύπαρξη συγκεκριμένου υποδοχέα (receptor) χαρπινών, σε φυτά καπνού έχει αναγνωριστεί η ύπαρξη ενός γονιδίου κινάσης, το οποίο είναι πιθανό να έχει λειτουργία υποδοχέα/μορίου δέκτη (Schreiber and Desveaux, 2008).

Γενικά, οι χαρπίνες των βακτηρίων έχουν ερευνηθεί εκτενώς τόσο σε επίπεδο βασικής έρευνας, που αφορά τη λειτουργία τους στα φυτοπαθογόνα βακτήρια αλλά και στους ξενιστές αυτών, όσο και σε επίπεδο εφαρμοσμένης έρευνας, όπου διερευνάται η δυνατότητα αξιοποίησής τους για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε βιοτικούς ή/και αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης.

Αναφέρεται ότι η χαρπίνη Hrp_{EA} που προέρχεται από το βακτήριο *Erwinia amylovora* προκαλεί εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης, εξωκυτταρική αλκαλοποίηση, και εκροή καλίου σε φυτικά κύτταρα καπνού που καλλιεργούνται σε αιώρημα (Tampakaki and Panopoulos, 2000). Επιπρόσθετα, η χαρπίνη Hrp_N που προέρχεται από το ίδιο βακτήριο, βρέθηκε ότι αυξάνει την ανθεκτικότητα έναντι του μύκητα *Peronospora parasitica* και του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC3000), μειώνοντας τον αριθμό των σχηματιζόμενων κονιδιοσπορίων και αποικιών αντίστοιχα, όταν εφαρμόστηκε σε φυτά αραβίδοψης (Dong et al., 1999). Πρόσφατες έρευνες αναφέρουν επίσης ότι η χαρπίνη Hrp_{1X_{oo}} που προέρχεται από το βακτήριο *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* όταν εφαρμόστηκε σε γενετικά τροποποιημένα φυτά βαμβακιού προσέδωσε αυξημένη

ανθεκτικότητα έναντι ποικίλων παθογόνων εδάφους, συμπεριλαμβανομένου του μύκητα *Verticillium dahliae* (Miao et al., 2010).

Η χαρπίνη HrpZ_{P_{sph}} από το βακτήριο *P. syringae* pv. *phaseolicola* που εφαρμόστηκε σε φυτά του είδους *N. benthamiana* για ανθεκτικότητα στον ιό της ριζομανίας των ζαχαρότευτλων (*Beet necrotic yellow vein virus*, BNYYV), είχε ως αποτέλεσμα εκτός από την ενίσχυση της ανθεκτικότητας των φυτών, αυξημένη ανάπτυξη και μειωμένη ικανότητα γονιμοποίησης (19%) (Pavli et al., 2011). Η ίδια χαρπίνη βρέθηκε πως παρουσιάζει ισχυρή σύνδεση με τα λιποσώματα και τις στοιβάδες λιπιδίων και προκαλεί ηλεκτρική αγωγιμότητα (Lee et al., 2001). Τέλος, η χαρπίνη HrpZ_{P_{ss}} που συναντάται στο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* προσδένεται στο εξωτερικό τμήμα των κυττάρων καπνού που καλλιεργούνται σε αιώρημα, προκαλώντας εκροή ιόντων καλίου και εξωκυτταρική αλκαλοποίηση, σύμπτωμα το οποίο δεν παρατηρείται στους πρωτοπλάστες (Hoyos et al., 1996).

Τα τελευταία χρόνια έχουν δημιουργηθεί διάφορα εμπορικά σκευάσματα χαρπινών. Το πρώτο και πιο γνωστό σκεύασμα είναι το Messenger, το οποίο συντίθεται από την χαρπίνη Ea του *Erwinia amylovora*. Το σκεύασμα αυτό εφαρμόζεται είτε με διαφυλλικό ψεκασμό είτε με ριζοπότισμα. Κατά την επαφή με το φυτό, προκαλεί ενεργοποίηση ενζύμων για την παραγωγή πρωτεϊνών, οι οποίες στη συνέχεια διεγείρουν τα βιοχημικά μονοπάτια που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα φυτά.

Σύμφωνα με μελέτες, αποτέλεσμα της εφαρμογής του αποτελεί η επαγωγή ανθεκτικότητας σε μεγάλος εύρος φυτών έναντι μυκήτων, βακτηρίων, ιών, νηματωδών, εντόμων, καθώς και αβιοτικών καταπονήσεων. Επίσης, σύμφωνα με την εταιρία, η εφαρμογή του επιφέρει καλύτερη απορρόφηση θρεπτικών στοιχείων, αυξημένη φωτοσύνθεση, ευρωστία καθώς και μεγαλύτερη διάρκεια ζωής των προϊόντων στο ράφι (<http://www.triachem.com/Products>).

1.6 Το είδος *Nicotiana benthamiana*

Το φυτό *Nicotiana benthamiana* είναι ένα άγριο είδος καπνού το οποίο είναι ιθαγενές της Αυστραλίας, όπου και συναντάται με μεγάλη μορφολογική, γενετική και φυσιολογική παραλλακτικότητα, λόγω του ότι έχει εγκατασταθεί σε διάφορα περιβάλλοντα, όπως και άλλα είδη του ίδιου γένους. Από γενετική άποψη, πρόκειται για ένα φυτικό είδος με 19 ζεύγη χρωμοσωμάτων και μέγεθος γονιδιώματος ~ 3,136 Mbp.

Το συγκεκριμένο είδος τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται εκτεταμένα από την επιστημονική κοινότητα ως φυτό μοντέλο, ιδίως σε μελέτες που σχετίζονται με τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτών και παθογόνων οργανισμών. Η ευρεία αυτή αξιοποίηση για ερευνητικούς σκοπούς, έγκειται στο γεγονός ότι το εν λόγω είδος παρουσιάζει ορισμένα αξιοσημείωτα χαρακτηριστικά.

Αρχικά, το είδος *N. benthamiana* αναπτύσσεται εύκολα και γρήγορα (Li et al., 2012) και προσβάλλεται από ένα ευρύ φάσμα φυτοπαθογόνων ιών και άλλων παθογόνων, που δεν έχουν ως ξενιστή τους το άλλο εξίσου χρησιμοποιούμενο φυτό - μοντέλο *Arabidopsis thaliana*, παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα να εξαχθούν πολύτιμα συμπεράσματα που αφορούν σε καλλιεργούμενα είδη που ανήκουν στην ίδια οικογένεια, δηλαδή των Solanaceae, αλλά και στις αλληλεπιδράσεις φυτών-παθογόνων γενικότερα.

Ιδιαίτερης σημασίας είναι η δυνατότητα ευχερούς μετασχηματισμού και αναγέννησης του είδους, με αποτέλεσμα να καθίσταται δυνατή η έκφραση πληθώρας διαγονιδίων και η επακόλουθη μελέτη της λειτουργίας τους. Προς την κατεύθυνση αυτή, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι στη διεθνή βιβλιογραφία παρέχεται πλήθος μεθοδολογιών τόσο για το σταθερό όσο και τον παροδικό μετασχηματισμό του είδους. Ενδεικτικά αναφέρεται η ύπαρξη πρωτοκόλλων γενετικού μετασχηματισμού με τη χρήση του ευρέως χρησιμοποιούμενου βακτηριακού φορέα *Agrobacterium tumefaciens* (Horsch et al., 1985a; b), ιικών φορέων, όπως ο *Potato virus X* (PVX) (Du et al., 2014), καθώς και με τη χρήση μεθόδων άμεσου μετασχηματισμού που περιλαμβάνουν την εφαρμογή πολυαιθυλενικής γλυκόλης (PEG) (Gharti-Chhetri et al., 2006), την ηλεκτροπόρωση (Wu and Feng, 1999) και τη βιολιστική μέθοδο (Ueki et al., 2013).

Τα τελευταία χρόνια, το ερευνητικό ενδιαφέρον στράφηκε επίσης στην αξιοποίηση του *N. benthamiana* για την παροδική έκφραση διαγονιδίων με άγνωστες λειτουργίες. Για το σκοπό αυτό, αξιοποιείται κατά κύριο λόγο η μέθοδος του αγροεμποτισμού (agroinfiltration) που περιλαμβάνει τον εμποτισμό της φυλλικής επιφάνειας με κύτταρα φορέα, βακτηριακής ή ιικής προέλευσης, που εκφράζουν τα υπό μελέτη γονίδια (Εικόνα 1.3).

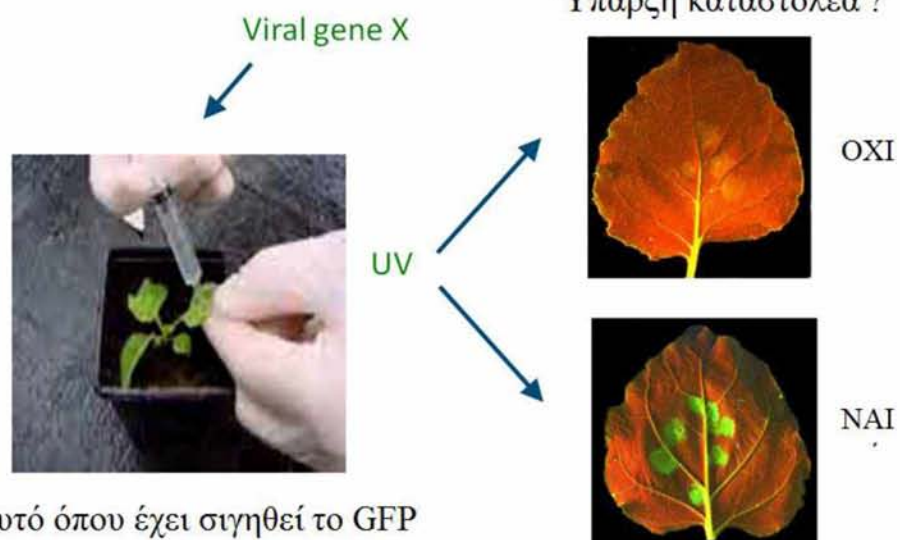
Η παροδική έκφραση γονιδίων, μέσω του αγροεμποτισμού, χρησιμοποιείται κατά κόρον για τη μελέτη της λειτουργίας γονιδίων ή/και ρυθμιστικών στοιχείων (μεταγραφικοί παράγοντες), τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ φυτών-παθογόνων, καθώς και την ταυτοποίηση καταστολέων της γονιδιακής σίγησης (Εικόνα 1.4).



Εικόνα 1.3: Μέθοδος παροδικής έκφρασης διαγονιδίων, μέσω αγροεμποτισμού, σε φύλλα του είδους *Nicotiana benthamiana* (Πηγή: <http://biology.fullerton.edu/msacco/Research.html>).

Τα τελευταία χρόνια, ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει επίσης αποκτήσει η αξιοποίηση του αγροεμποτισμού για την παραγωγή ετερόλογων πρωτεϊνών, δευτερογενών μεταβολιτών και άλλων ουσιών με αυξημένη προστιθέμενη αξία και εφαρμογή στη βιομηχανία φαρμάκων, καλλυντικών κ.α..

Αγροεμποτισμός (*Agrobacterium*)



Εικόνα 1.4: Διερεύνηση της λειτουργίας ενός γονιδίου X ικής προέλευσης ως πιθανού καταστολέα της γονιδιακής σίγησης (RNA silencing suppressor). Διαγονιδιακά φυτά όπου έχει σιγηθεί η έκφραση της πρωτεΐνης GFP (GFP-silenced plant) εμποτίζονται με βακτηριακά κύτταρα τα οποία εκφράζουν το υπό μελέτη γονίδιο X. Κατόπιν έκθεσης σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV), είναι δυνατή η ταυτοποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν καταστολείς της γονιδιακής σίγησης. Η ύπαρξη καταστολέα ταυτοποιείται μέσω του φθορίζοντα φαινοτύπου.

Τέλος, σημαντικό πλεονέκτημα της χρήσης του *N. benthamiana* αποτελεί το γεγονός ότι το είδος αυτό χαρακτηρίζεται από μικρό σχετικά βιολογικό κύκλο, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική επιτάχυνση των διαδικασιών γενετικού μετασχηματισμού, αναγέννησης και αξιολόγησης της ανθεκτικότητας ή της λειτουργίας των υπό μελέτη διαγονιδίων.

1.7 Σκοπός της Εργασίας

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει ευρέως γνωστή η ιδιότητα των χαρπινών να επάγουν ανθεκτικότητα έναντι τόσο βιοτικών όσο και αβιοτικών καταπονήσεων σε διάφορα φυτά, μέσω σύνθετων μοριακών μηχανισμών οι οποίοι δεν έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί.

Στα πλαίσια αυτά, η παρούσα εργασία αφορά αρχικά στην ανάπτυξη διαγονιδιακών φυτών του είδους *Nicotiana benthamiana* που εκφράζουν τη χαρπίνη HrpZ_{P_{sph}}, που προέρχεται από το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Επιμέρους στόχοι της μελέτης αποτελούν α) ο έλεγχος της ομοζύγωσης/ετεροζύγωσης κατάστασης των διαγονιδίων σε φυτά T₂ γενιάς και η επιλογή αποκλειστικά ομοζύγων διαγονιδιακών φυτών, τα οποία εκφράζουν ενδογενώς το γονίδιο SP/hrpZ_{P_{sph}}, β) η ανάπτυξη ομοζύγων διαγονιδιακών φυτών T₃ γενιάς και γ) η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας ομοζύγων διαγονιδιακών φυτών T₃ γενιάς, σε σύγκριση με φυτά μάρτυρες, έναντι του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC3000) και του ιού του μωσαϊκού του καπνού (*Tobacco mosaic virus*, TMV).

Για την υλοποίηση των στόχων της μελέτης, αρχικά πραγματοποιήθηκε βλάστηση σπόρων των διαγονιδιακών σειρών (T₂) του είδους *Nicotiana benthamiana* σε θρεπτικό μέσο επιλογής και ακολούθησε επιλογή των ομοζύγων για το διαγονίδιο σειρών T₂. Οι σπόροι αυτογονιμοποίησης (T₃) των επιλεγμένων - ομοζύγων σειρών αναπτύχθηκαν στο θερμοκήπιο και ακολούθησε η αξιολόγησή τους με μοριακές μεθόδους.

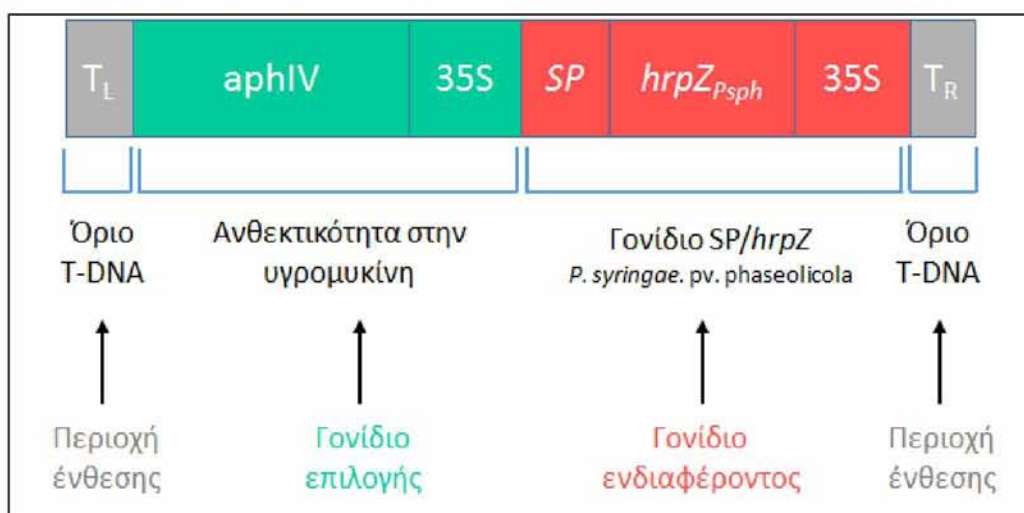
Στο πλαίσιο διερεύνησης της πιθανούς ανάπτυξης ευρείας ανθεκτικότητας, λόγω της έκφρασης της πρωτεΐνης SP/HrpZ_{P_{sph}}, πραγματοποιήθηκε μόλυνση των φυτών κατάλληλου αναπτυξιακού σταδίου με το βακτήριο *P. syringae* pv. *tomato* και τον ιό του μωσαϊκού του καπνού (*Tobacco mosaic virus*, TMV). Τέλος, πραγματοποιήθηκε η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας των διαγονιδιακών φυτών, σε σύγκριση με φυτά αγρίου τύπου, τόσο σε μακροσκοπικό επίπεδο, όσο και με μεθόδους ποσοτικοποίησης του παθογόνου. Τα αποτελέσματα αναμένεται να δώσουν μια νέα ώθηση στην αντιμετώπιση των παθογόνων αυτών σε καλλιεργούμενα φυτά.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Φυτικό υλικό

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή προέρχεται από προηγούμενη έρευνα κατά την οποία αναπτύχθηκαν γενετικά τροποποιημένα φυτά του είδους *Nicotiana benthamiana* που εκφράζουν το διαγονίδιο SP/*hrpZ*_{P_{sph}} (Pavli et al., 2011; 2012). Στην παρούσα μελέτη, οι επεμβάσεις καταπόνησης, καθώς και η αξιολόγηση της διαγονιδιακής ανθεκτικότητας αφορούν φυτά T₃ γενιάς. Το άγριο είδος καπνού *Nicotiana benthamiana* αποτελεί ευρέως χρησιμοποιούμενο είδος ως φυτό - μοντέλο για ερευνητικούς σκοπούς.

Για το σταθερό μετασχηματισμό φυτών του είδους *N. benthamiana* χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος του *Agrobacterium tumefaciens* C58C1. Τα βακτηριακά κύτταρα μετασχηματίστηκαν με το πλασμίδιο pBin.Hyg.Tx-SP/*hrpZ*_{P_{sph}} (Tampakaki and Panopoulos, 2000). Το πλασμίδιο περιείχε το γονίδιο *hrpZ*, που προέρχεται από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *P. syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121 (μεγέθους 995 bp), ως προϊόν σύντηξης με το πεπτίδιο έκκρισης PR1, ώστε να κατευθύνεται η έκκριση της πρωτεΐνης (SP/*HrpZ*_{P_{sph}}) στον αποπλάστη των φυτών (Σχήμα 2.1) (Tampakaki and Panopoulos, 2000; Pavli et al., 2011).



Σχήμα 2.1: Απεικόνιση της γονιδιακής κατασκευής που χρησιμοποιήθηκε για το γενετικό μετασχηματισμό φυτών του είδους *N. benthamiana*. Η υπό μεταφορά περιοχή περιείχε το γονίδιο *hrpZ*, που προέρχεται από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *P. syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121 (μεγέθους 995 bp), ως προϊόν σύντηξης με το πεπτίδιο έκκρισης PR1 καθώς και το γονίδιο *aphIV* (hygromycin B phosphotransferase) που προσδίδει ανθεκτικότητα στην υγρομυκίνη.

2.2 Αξιολόγηση των Διαγονιδιακών Φυτών

2.2.1 Επιλογή των Διαγονιδιακών Σειρών

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν γενετικά τροποποιημένα φυτά του είδους *Nicotiana benthamiana* που εκφράζουν το διαγονίδιο SP/*hrpZ_{P_{sph}}* (Pavli et al., 2011; 2012). Το αρχικό γενετικό υλικό συνιστά σπόρους T₂ γενιάς, οι οποίοι ελέγχθηκαν ως προς τη διαγονιδιακή τους φύση και την ομοζύγωτη/ετεροζύγωτη κατάσταση του διαγονιδίου SP/*hrpZ_{P_{sph}}*.

Προκειμένου να διαπιστωθεί η διαγονιδιακή φύση των φυτών (T₂ γενιά), πραγματοποιήθηκε βλάστηση των σπόρων σε θρεπτικό μέσο επιλογής που περιείχε το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής (υδρομυκίνη, 30 mg/l). Για το σκοπό αυτό, αρχικά πραγματοποιήθηκε απολύμανση των σπόρων T₂ γενιάς. Η απολύμανση έγινε με τοποθέτηση των σπόρων σε διάλυμα χλωρίνης 15 %, υπό συνεχή ανάδευση, για 5 min και στη συνέχεια έκπλυση (4x) με αποστειρωμένο dH₂O.

Στη συνέχεια, οι απολυμασμένοι σπόροι T₂ γενιάς εξετάστηκαν για τη διαγονιδιακή τους φύση μέσω βλαστικής επιλογής σε θρεπτικό μέσο (MS με βιταμίνες, NAA 0,1mg/l, BAP 1mg/l, 3% ζαχαρόζη και 5 gr/l agar) που περιείχε υδρομυκίνη (30 mg/l). Προκειμένου να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα της χρησιμοποιούμενης πίεσης επιλογής, στις διαδικασίες βλάστησης σπόρων σε θρεπτικό μέσο επιλογής συμπεριλήφθηκαν και σπόροι αγρίου τύπου.

Μετά από επώαση περίπου 2 εβδομάδων σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών, καταγράφηκε το ποσοστό βλάστησης των σπόρων, υπό συνθήκες πίεσης επιλογής. Στο διάστημα αυτό καταμετρήθηκαν τα ανθεκτικά στην υδρομυκίνη φυτά και πραγματοποιήθηκε επιλογή των T₂ διαγονιδιακών σειρών, με βάση την ύπαρξη διάσπασης ως προς το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό επιλογής.

Αφού επιλέχθηκαν οι ομοζύγωτες για το διαγονίδιο σειρές (T₂ γενιά), πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξή τους σε θρεπτικό μέσο επιλογής που περιείχε υδρομυκίνη και στη συνέχεια ακολούθησε σκληραγώγηση των φυτών, με μεταφύτευση σε μίγμα χώματος με τύρφη (3:1) και σταδιακή μείωση της υγρασίας.

Οι σπόροι αυτογονιμοποίησης (T₃) των επιλεγμένων - ομοζύγων σειρών τοποθετήθηκαν σε μίγμα χώματος με τύρφη (3:1) (22/03/2016) και αναπτύχθηκαν στο θερμοκήπιο. Ακολούθησε μεταφύτευση των σπορόφυτων με σκοπό τη μεμονωμένη ανάπτυξή τους και τη διευκόλυνση στους χειρισμούς μόλυνσης και αξιολόγησης της ανθεκτικότητας.

Για τις ανάγκες του πειράματος συμπεριλήφθηκαν ως μάρτυρες και φυτά αγρίου τύπου.

2.2.2 Έλεγχος για την ένθεση του διαγονιδίου *SP/hrpZ_{Psph}*

Τα μετασχηματισμένα φυτά (T₃) ελέγχθηκαν για την ένθεση του διαγονιδίου και την απουσία του γονιδίου *virG* του *A. tumefaciens*, μέσω αντίδρασης πολλαπλής PCR. Για την επιβεβαίωση του μετασχηματισμού, απομονώθηκε DNA από τα T₃ φυτά (NucleoSpin® Plant II, Macherey-Nagel GmbH & Co), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Απομόνωση γονιδιωματικού DNA

Αρχικά έγινε ομογενοποίηση του φυτικού ιστού με υγρό άζωτο, έτσι ώστε η τελική ποσότητα που θα περιέχονταν στο φιαλίδιο να κυμαίνεται στα 100mg. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 400μl buffer PL1 (διάλυμα λύσης των κυττάρων), έγινε ανακίνηση (vortex), προστέθηκαν 10μl RNAase A και τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο υδατόλουτρο στους 65° C για 10 min. Με το πέρας του χρονικού αυτού διαστήματος, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο φιαλίδιο με φίλτρο, έγινε φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 2 min και απομακρύνθηκε το φίλτρο. Στην ποσότητα που διατηρήθηκε προστέθηκαν 450μl buffer PC και έγινε καλή ανακίνηση του μίγματος με το χέρι. Έπειτα, η ποσότητα αυτή (περίπου 700μl) μεταφέρθηκε σε νέο φιαλίδιο με φίλτρο, έτσι ώστε να προσδεθεί το DNA, και φυγοκεντρήθηκε στις 11000 rpm για 1 min. Έστερα, στην ποσότητα που περιέχεται στο φίλτρο προστέθηκαν 400μl buffer PW1, ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 1 min και απομάκρυνση του υποκείμενου διαλύματος. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 700μl buffer PW2 (διάλυμα πλύσεως), ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 1 min και απομάκρυνση του υποκείμενου διαλύματος. Στην ποσότητα που παρέμεινε προστέθηκαν 200μl buffer PW2, έγινε εκ νέου φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 2 min και απομάκρυνση του υποκείμενου διαλύματος. Στη συνέχεια, το φίλτρο μαζί με την ποσότητα DNA που διατήρησε, τοποθετήθηκε σε νέο φιαλίδιο, στο οποίο προστέθηκαν 50μl buffer PE και τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο υδατόλουτρο στους 65° C για 5min. Η ποσότητα αυτή φυγοκεντρήθηκε στις 11000 rpm για 1 min, ακολούθως προστέθηκαν 30μl buffer PE και μεταφέρθηκαν ξανά στο υδατόλουτρο για 5 min. Τέλος, τα δείγματα αφού φυγοκεντρήθηκαν στις 11000 rpm για 1min, διατηρήθηκαν στην κατάψυξη στους -20° C.

Αντιδράσεις πολλαπλής PCR και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων ενίσχυσης

Ακολούθησε πολλαπλή αντίδραση PCR με σκοπό την ενίσχυση του γονιδίου της χαρπίνης και της αλληλουχίας που κωδικοποιεί την περιοχή *virG* του *A. tumefaciens*. Η ενίσχυση των επιλεγμένων αλληλουχιών, πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τα ζεύγη εκκινητών που περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.1) (Pavli et al., 2011).

Πίνακας 2.1: Τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του διαγονιδίου *hrpZ_{P_{sph}}* και της περιοχής *virG* του *A. tumefaciens* καθώς και οι αλληλουχίες τους.

Γονίδιο/Περιοχή	Εκκινητής	F/R	Αλληλουχία
<i>hrpZ_{P_{sph}}</i>	<i>hrpZ</i>	F	5'-CGAAAGCCCGCATATGGCGCTCGTTCTG-3'
		R	5'- CCGTCAGCGGGATCCAGTCAGGCAGCAG-3'
<i>virG</i>	<i>virG</i>	F	5'-GCCGGGGCGAGACCATAGG-3'
		R	5'- CGCACGCGCAAGGCAACC-3'

Το μίγμα της PCR, τελικού όγκου 20μl, περιείχε 2μl DNA ως μήτρα, 0.25μM από κάθε εκκινητή, 200μM dNTPs, 1.25mM MgCl₂, 1x *Taq* ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) και 1.25u *Taq* πολυμεράση (GoTaq Flexi DNA polymerase, Promega), ενώ το πρόγραμμα της αντίδρασης ενίσχυσης συγγοψίζεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.2).

Πίνακας 2.2: Πρωτόκολλο αντιδράσεων ενίσχυσης PCR.

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	94	3 min	-
Αποδιάταξη	94	30 sec	30
Υβριδισμός	50	1 min	30
Επιμήκυνση	72	1 min	30
Τελική επιμήκυνση	72	5 min	-

Τα προϊόντα ενίσχυσης αξιολογήθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% με ρυθμιστικό διάλυμα TAE (1X) που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο.

2.2.3 Έλεγχος για την έκφραση του διαγονιδίου *SP/hrpZ_{PspH}*

Για τον έλεγχο της έκφρασης του διαγονιδίου, αρχικά απομονώθηκε RNA από τα αναγεννημένα-ανθεκτικά στην υδρομυκίνη φυτά. Η απομόνωση του RNA επετεύχθη με τη χρήση του NucleoSpin® RNA Plant (Macherey-Nagel GmbH & Co), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Απομόνωση ολικού RNA

Αρχικά, έγινε ομογενοποίηση 100mg φυτικού ιστού (φύλλα) σε υγρό άζωτο. Στη συνέχεια, έγινε λύση των κυττάρων με προσθήκη 350μL buffer RA1 και 3.5μL β-μερκαπτοαιθανόλη και ανακίνηση vortex. Έπειτα, για να μειωθεί το ιξώδες του μίγματος, η περιεχόμενη ποσότητα μεταφέρθηκε σε νέο φιαλίδιο με φίλτρο και φυγοκεντρήθηκε στις 11000 rpm για 1min. Αφού απομακρύνθηκε το φίλτρο, προστέθηκαν 350μL αιθανόλη 70% και έγινε καλή ανακίνηση με το χέρι. Ακολούθησε μεταφορά του μίγματος σε νέο φιαλίδιο με φίλτρο, φυγοκέντρωση στις 11000 rpm για 30 sec, προσθήκη 350μL MDB και εκ νέου φυγοκέντρωση στις 11000 rpm για 1min. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 95μL DNase reaction mixture (10 μL reconstituted rDNase, 90 μL Reaction Buffer for rDNase) και τα φιαλίδια παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min. Έπειτα, σε νέο φιαλίδιο με φίλτρο μεταφέρθηκε το μίγμα, προστέθηκαν 200μL Buffer RAW2 και έγινε φυγοκέντρωση στις 11000 rpm για 30 sec. Αφού απομακρύνθηκε η υγρή φάση, προστέθηκαν 600μL Buffer RA3, έγινε φυγοκέντρωση στις 11000 rpm για 30 sec, απομακρύνθηκαν τα λύματα, έγινε εκ νέου προσθήκη 250μL RA3 και φυγοκέντρωση στις 11000 rpm για 2 min. Το τελευταίο βήμα, που αφορά στην έκλυση του ολικού RNA, περιελάμβανε προσθήκη 60μL RNase-free H₂O και φυγοκέντρωση στις 11000 rpm για 1 min.

Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός του εξαγόμενου RNA

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του RNA έγινε φωτομετρικά, με τη χρήση του οργάνου Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Εικόνα 2.2). Συγκεκριμένα, 1 μ l από το κάθε δείγμα μεταφέρθηκε στη συσκευή Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer και στη συνέχεια προσδιορίστηκε η οπτική πυκνότητα του δείγματος στα 230, 260 και 280 nm. Ο μηδενισμός του οργάνου γινόταν με μια σταγόνα (1 μ l) RNase-free H₂O από το RNAeasy plant mini kit. Η καθαρότητα ενός δείγματος εκτιμάται από τους λόγους OD₂₆₀/OD₂₈₀ και OD₂₆₀/OD₂₃₀.



Εικόνα 2.2: Συσκευή Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer

Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Η σύνθεση μορίων DNA, συμπληρωματικών ως προς το RNA, έγινε με αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription). Συνολικά, παράχθηκε συμπληρωματικό DNA (cDNA) για 20 επιλεγμένα δείγματα. Η σύνθεση συμπληρωματικού DNA, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen™), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Ειδικότερα, το πρώτο βήμα περιελάμβανε προσθήκη σε σωλήνα eppendorf 2-10 μ g ολικού RNA, 1 μ l oligo dT (500 μ g/ml), 1 μ l μίγμα dNTPs (10 mM) και mQ H₂O έως τελικού όγκου 12 μ l. Ακολούθησε αποδιάταξη των δειγμάτων στους 65°C για χρονικό διάστημα 5 min, όπου και πραγματοποιήθηκε ο υβριδισμός του εκκινητή με το RNA, και το δείγμα μεταφέρθηκε άμεσα σε πάγο, ώστε να διατηρηθεί σε μονόκλωνη κατάσταση. Στη συνέχεια, έγινε μια σύντομη φυγοκέντρηση και μετά το πέρας αυτής, προστέθηκαν 4 μ l 5x First-Strand Buffer, 1 μ l (40unit/ μ l) RNaseOUT και 2 μ l 0.1 M DTT. Αφού έγινε μια ήπια ανάδευση του περιεχομένου των σωλήνων eppendorf, τα δείγματα προθερμάνθηκαν στους 42°C για 2 min και προστέθηκε 1 μ l (200 units) SuperScript II RT.

Τελικά, το μίγμα επώαστηκε στους 42°C για χρονικό διάστημα 50 min και ακολούθησε απενεργοποίηση του ενζύμου με θέρμανσή του στους 70°C για 15 min.

Αντιδράσεις RT-PCR και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων ενίσχυσης

Το cDNA που προέκυψε, χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα στις αντιδράσεις PCR (RT-PCR). Η ενίσχυση του διαγονιδίου πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των εκκινητών που προαναφέρθηκαν (hrpZ F: 5'-CGAAAGCCCCGCATATGGCGCTCGTTCTG-3' και hrpZ R 5'-CCGTCAGCGGGATCCAGTCAGGCAGCAG-3') (Πίνακας 2.1).

Το μίγμα της PCR, τελικού όγκου 20μl, περιείχε 2μl cDNA ως μήτρα, 0.25μM από κάθε εκκινητή, 200μM dNTPs, 1.25mM MgCl₂, 1x *Taq* ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) και 1.25u *Taq* πολυμεράση (GoTaq Flexi DNA polymerase, Promega), ενώ το πρόγραμμα της ενίσχυσης περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.3).

Πίνακας 2.3: Πρωτόκολλο αντιδράσεων ενίσχυσης RT-PCR.

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	94	3 min	-
Αποδιάταξη	94	30 sec	30
Υβριδισμός	50	1 min	30
Επιμήκυνση	72	1 min	30
Τελική επιμήκυνση	72	5 min	-

Τα προϊόντα ενίσχυσης της PCR αξιολογήθηκαν με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αгарόζης 1% με ρυθμιστικό διάλυμα TAE (1X), η οποία περιείχε 1% βρωμιούχο αιθίδιο.

2.2.4 Έλεγχος της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται σε βιοχημικά μονοπάτια άμυνας των φυτών

Για τον έλεγχο της επαγωγής γονιδίων που σχετίζονται με την αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) καθώς και με γνωστά βιοχημικά μονοπάτια άμυνας των φυτών (*AOX*, *ColI*, *NPRI*, *SIPK*, *WIPK*, *hsr203j*, *PR1a*, *hinI*), πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις RT-PCR χρησιμοποιώντας ως μήτρα cDNA το οποίο συντέθηκε όπως περιγράφεται σε προηγούμενη

ενότητα. Στις αντιδράσεις RT-PCR χρησιμοποιήθηκαν εξειδικευμένοι για τα υπό μελέτη γονίδια εκκινητές (Πίνακας 2.4) (Pavli et al., 2011).

Πίνακας 2.4: Ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των υπό μελέτη γονιδίων.

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία (5'→3')	Μέγεθος προϊόντος (bp)
<i>AOX</i>	F	GCCATTGATTACTGCCGTCT	160
	R	ATACCCAATTGGTGCTGGAG	
<i>Coll</i>	F	CCAATTGGGCTTGACGTACT	228
	R	CAATCCTGAGCCGCTTTAAC	
<i>EF1a</i>	F	GAGGTTCGAGAAG-GAAGCTGCTGAG	669
	R	AGAGCTTCGTGGAGCATCTCAACAG	
<i>Hin1</i>	F	GAGCTCTAGATGGCCCTTCCATTCCGC	847
	R	GCTCTAGACGCCGAAAAACAAAAGG	
<i>Hsr203J</i>	F	CGCGGATCCGGCTGGCTTAGAGTTTTC	596
	R	TCCGGGATCCTCCGATAGGACCGCACG	
<i>NPR1</i>	F	ATGGATAATAGTAGGACTGCG	273
	R	GAACGGACTCCTCGCCGAC	
<i>PR1a</i>	F	GTAATATCCCACTCTTGCCGTGCCC	335
	R	CCTAGCACATCCAACACGAACCGAG	
<i>SIPK</i>	F	TATAATTCCACCACCACAGA	755
	R	CTTCATCTGTTCTCCGTAA	
<i>WIPK</i>	F	CAATTCCTGATTTTCCTTCGG	1158
	R	GGAAAGTAGATACTCCAGATC	

Το μίγμα της PCR ήταν τελικού όγκου 25μl και περιείχε 1 μl cDNA, 0.25 μM από κάθε εκκινητή, 200 μM dNTPs, 1.25 mM MgCl₂, 1x *Taq* buffer και 1.25 u *Taq* πολυμεράση (GoTaq Flexi DNA polymerase, Promega). Το πρόγραμμα ενίσχυσης που εφαρμόστηκε παρουσιάζεται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 2.5).

Πίνακας 2.5: Πρωτόκολλο αντιδράσεων ενίσχυσης RT-PCR για τη μελέτη της έκφρασης γονιδίων σχετιζόμενα με βιοχημικά μονοπάτια άμυνας των φυτών.

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	94	3 min	-
Αποδιάταξη	94	30 sec	25-30
Υβριδισμός	50	1 min	25-30
Επιμήκυνση	72	1 min	25-30
Τελική επιμήκυνση	72	7 min	-

Τα προϊόντα ενίσχυσης της PCR οπτικοποιήθηκαν με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αгарόζης 1% με ρυθμιστικό διάλυμα TAE (1X), η οποία περιείχε 1% βρωμιούχο αιθίδιο.

2.3 Τεχνητή μόλυνση των διαγονιδιακών φυτών (T₃) και αξιολόγηση της ανθεκτικότητας

Στο πλαίσιο των πειραμάτων αξιολόγησης της ανθεκτικότητας έναντι παθογόνων μικροοργανισμών, τα φυτά υποβλήθηκαν σε τεχνητή μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC3000) και τον ιό του μωσαϊκού του καπνού (*Tobacco mosaic virus*, TMV).

Η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας των διαγονιδιακών φυτών, σε σύγκριση με φυτά αγρίου τύπου, πραγματοποιήθηκε τόσο σε μακροσκοπικό επίπεδο όσο με μεθόδους ποσοτικοποίησης του παθογόνου.

Μηχανική μόλυνση με τον ιό του μωσαϊκού του καπνού (*Tobacco mosaic virus*, TMV) και αξιολόγηση της ανθεκτικότητας

Για την αξιολόγηση της ανθεκτικότητας πραγματοποιήθηκε μηχανική μόλυνση των διαγονιδιακών φυτών με μολυσμένο με τον ιό του μωσαϊκού του καπνού ιστό *N. tabacum*. Η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας έγινε σε φαινοτυπικό επίπεδο, μέσω μακροσκοπικών παρατηρήσεων, καθώς και με μέτρηση του ιικού φορτίου με τη μέθοδο DAS-ELISA. Για τα πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας έναντι του ιού του μωσαϊκού του καπνού (*Tobacco mosaic virus*, TMV), χρησιμοποιήθηκαν 6 φυτά από 5 διαφορετικές σειρές φυτών καπνού T₃ γενεάς.

Στο πείραμα συμπεριλήφθηκαν θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες για την εξασφάλιση της αξιοπιστίας των μετρήσεων αξιολόγησης της ανθεκτικότητας. Μη-μετασχηματισμένα φυτά (αγρίου τύπου) που μολύνθηκαν με το διάλυμα ισωματίων εξυπηρέτησαν ως θετικοί μάρτυρες (5), ενώ αγρίου τύπου φυτά που δεν υπέστησαν καμία μεταχείριση συμπεριλήφθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες (5). Συνολικά αξιολογήθηκαν 30 διαγονιδιακά φυτά και 10 φυτά αγρίου τύπου.

Ως πηγή ιικού μολύσματος χρησιμοποιήθηκε ιστός από μολυσμένο με τον ιό φύλλων καπνού. Το διάλυμα ισωματίων παρασκευάστηκε ομογενοποιώντας μολυσμένο ιστό (1:5 βάρος/όγκο) σε 0.05M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφόρου (phosphate buffer) pH-7.2.

Δύο τουλάχιστον φύλλα φυτών που βρίσκονταν στο στάδιο των 5-6 πραγματικών φύλλων επιπάστηκαν με σκόνη μίγματος άνθρακα-πυριτίου (καρβίδιο του πυριτίου, carborundum), ώστε να διευκολυνθεί η είσοδος ισωματίων, και στη συνέχεια μολύνθηκαν μηχανικά με εφαρμογή διαλύματος ισωματίων στην κατώτερη επιφάνεια των φύλλων. Ακολούθησε πλύση των μολυσμένων φύλλων με απιονισμένο νερό και τοποθέτησή τους σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (20-25° C, 16/8 ώρες).

Τα φυτά ελέγχονταν συστηματικά για την εμφάνιση και καταγραφή συμπτωμάτων μέχρι και 20 ημέρες μετά την μόλυνση. Η αξιολόγηση της ποσοτικοποίησης του παθογόνου πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο ανοσοανίχνευσης DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Ειδικότερα, η μέτρηση συσσώρευσης του ιού του μωσαϊκού του καπνού (*Tobacco mosaic virus*, TMV) πραγματοποιήθηκε 10 ημέρες μετά τη μόλυνση με τη χρήση του TMV ELISA kit (Neogen Europe Ltd, UK), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Η διαδικασία DAS-ELISA περιελάμβανε την εκτέλεση των παρακάτω βασικών σταδίων:

- 1) προσθήκη και πρόσδεση αντισωμάτων του ιού – απόπλυση,
- 2) προσθήκη ιού με τη μορφή χυμού από μολυσμένο ιστό – απόπλυση,
- 3) προσθήκη ικών αντισωμάτων, στα οποία προσκολλώνται μόρια ενζύμου – απόπλυση,
- 4) προσθήκη υποστρώματος για το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση (η διάσπαση του από το ένζυμο προκαλεί μακροσκοπική αλλαγή του χρώματός του) (Εικόνα 2.3).

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε επικάλυψη της πλάκας με το αντίσωμα πρόσδεσης. Το ρυθμιστικό διάλυμα επικάλυψης (coating buffer) διαλύθηκε σε απιονισμένο νερό σε αναλογία 1:5 και προστέθηκαν τα αντισώματα του ιού σε αναλογία 1:100. Η πρόσδεση αντισωμάτων στην πλάκα πραγματοποιήθηκε με την τοποθέτηση 100μl ρυθμιστικού διαλύματος επικάλυψης σε κάθε θέση και επώαση στους 37° C για 4 ώρες. Ακολούθησε 3x πλύση με PBS (Phosphate Buffered Saline) – TWEEN, pH=7.4 και εναπόθεση των δειγμάτων με λειοτρίβηση 1 g φυλλικού ιστού με 10 ml διαλύματος εξαγωγής (extraction buffer) σε αναλογία 1:5. Παράλληλα με τα υπό μελέτη δείγματα συμπεριλήφθηκαν θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες που εξυπηρετούν στην εξασφάλιση της αξιοπιστίας του πειράματος. Ύστερα, τα δείγματα επώαστηκαν στους 4° C για τουλάχιστον 16 ώρες και ακολούθησε 2x ξέπλυμα με PBS (Phosphate Buffered Saline) – TWEEN και 3x πλύσεις των τριών λεπτών με το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα (washing buffer). Για τη σύζευξη των αντισωμάτων, προστέθηκαν 100μl ρυθμιστικού διαλύματος σύζευξης (conjugate buffer) που περιείχε το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα σε αναλογία 1:5 με απιονισμένο νερό και αντισώματα σε αναλογία 1:100. Η επώαση έγινε στους 37° C για 1 ώρα και ακολούθησαν 3x πλύσεις με PBS (Phosphate Buffered Saline) – TWEEN. Αφού προετοιμάστηκε το διάλυμα υποστρώματος με προσθήκη pNPP σε 1 mg/ml, πραγματοποιήθηκε εναπόθεση 100μl ρυθμιστικού διαλύματος υποστρώματος (substrate buffer) που περιείχε το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα, σε αναλογία 1:5 με απιονισμένο νερό και pNPP σε αναλογία 1:1 και η πλάκα επώαστηκε υπό συνθήκες σκότους στους 37° C για 1 ώρα. Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας έγινε σε φασματοφωτόμετρο στα 405nm.

Κάθε δείγμα ελέγχθηκε σε δύο επαναλήψεις. Ως θετικές λήφθηκαν εκείνες οι τιμές απορρόφησης που ήταν ίσες ή μεγαλύτερες από το διπλάσιο του αρνητικού μάρτυρα του kit και των φυτών που συμπεριλήφθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες του πειράματος (φυτά που δεν μολύνθηκαν μηχανικά με τον ιό).

Μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC3000) και αξιολόγηση της ανθεκτικότητας

Προκειμένου να ελεγχθεί η δράση του γονιδίου *SP/hrpZ_{P_{sph}}*

 σε σχέση με την ασθένεια της βακτηριακής κηλίδωσης του καπνού, πραγματοποιήθηκαν μολύνσεις σε φυτά ηλικίας περίπου 6 εβδομάδων με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC3000). Συγκεκριμένα, μολύνθηκαν 6 φυτά από 5 διαφορετικές σειρές φυτών καπνού T₃ γενεάς.

Στο πείραμα συμπεριλήφθηκαν θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες για την εξασφάλιση της αξιοπιστίας των μετρήσεων αξιολόγησης της ανθεκτικότητας. Μη-μετασχηματισμένα φυτά (αγρίου τύπου) που μολύνθηκαν με το αιώρημα βακτηριακών κυττάρων εξυπηρέτησαν ως θετικοί μάρτυρες (5), ενώ αγρίου τύπου φυτά που δεν υπέστησαν καμία μεταχείριση συμπεριλήφθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες (5). Συνολικά αξιολογήθηκαν 30 διαγονιδιακά φυτά και 10 φυτά αγρίου τύπου.

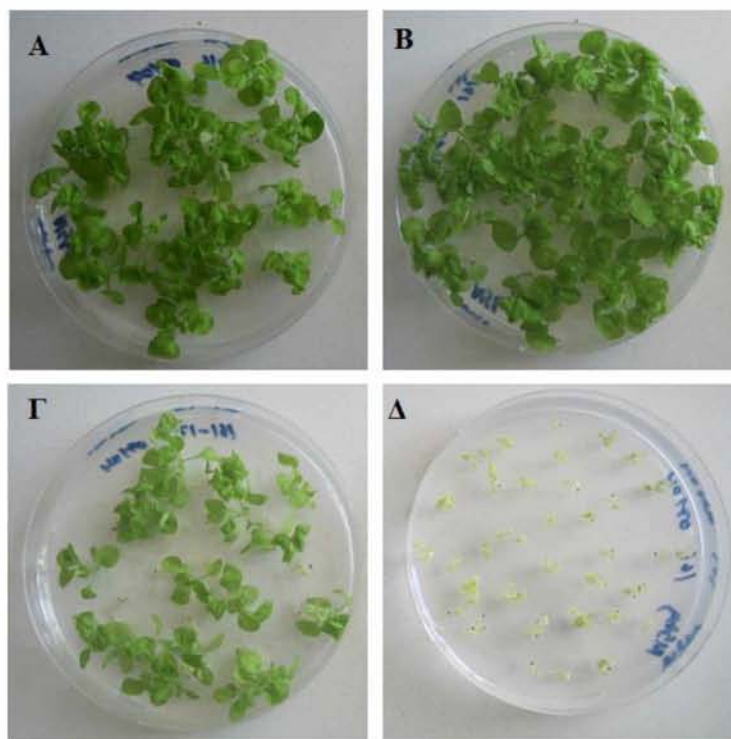
Αρχικά, το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC3000) καλλιεργήθηκε σε 15ml υγρού μέσου LB με ριφαμπυκίνη 100mg/l και καναμυκίνη 50mg/l για δύο ημέρες, στους 28 °C υπό ανάδευση. Κατά το διάστημα επώασης, πραγματοποιούνταν μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας OD₆₀₀. Όταν η οπτική πυκνότητα είχε φθάσει το OD₆₀₀ = 0.6, η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε στις 3.000 rpm για 5 min, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και τα βακτηριακά κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε dH₂O ώστε να δημιουργηθεί αιώρημα βακτηρίων συγκέντρωσης 10⁸ βακτήρια /ml. Ακολούθησε προσθήκη Tween-20 (0.5%). Τα φυτά ψεκάστηκαν με το αιώρημα βακτηρίων και στη συνέχεια, καλύφθηκαν με πλαστική σακούλα για 4 ημέρες.

3. Αποτελέσματα

3.1 Επιλογή και Ανάπτυξη Διαγονιδιακών Φυτών

Το αρχικό γενετικό υλικό συνιστά σπόρους του είδους *Nicotiana benthamiana* (T₂ γενιά), οι οποίοι εκφράζουν ενδογενώς το διαγονίδιο *SP/hrpZ_{P_{sph}}* που κωδικοποιεί την εκκρινόμενη μορφή της χαρπίνης, μέσω της ένθεσης του τμήματος του N-αμινοτελικού άκρου του πεπτιδίου της πρωτεΐνης παθογένειας PR1 του καπνού (Tampakaki and Panopoulos, 2000; Pavli et al., 2011).

Προκειμένου να ελεγχθεί η διαγονιδιακή φύση και η ομοζύγωτη/ετεροζύγωτη κατάσταση του διαγονιδίου για τη δημιουργία ομοζύγων T₃ οικογενειών από σπόρο αυτογονιμοποίησης, αρχικά ελέγχθηκαν 20 διαγονιδιακές σειρές T₂ γενιάς. Η επιλογή πραγματοποιήθηκε με βάση τις αναλογίες διάσπασης ως προς το γονίδιο ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη. Ειδικότερα, καταμετρήθηκαν τα ανθεκτικά στην υγρομυκίνη φυτά και πραγματοποιήθηκε επιλογή των ομοζύγων T₂ διαγονιδιακών σειρών, βάσει της απουσίας διάσπασης ως προς το γνώρισμα ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη (βλάστηση όλων των σπόρων) (Εικόνα 3.1).

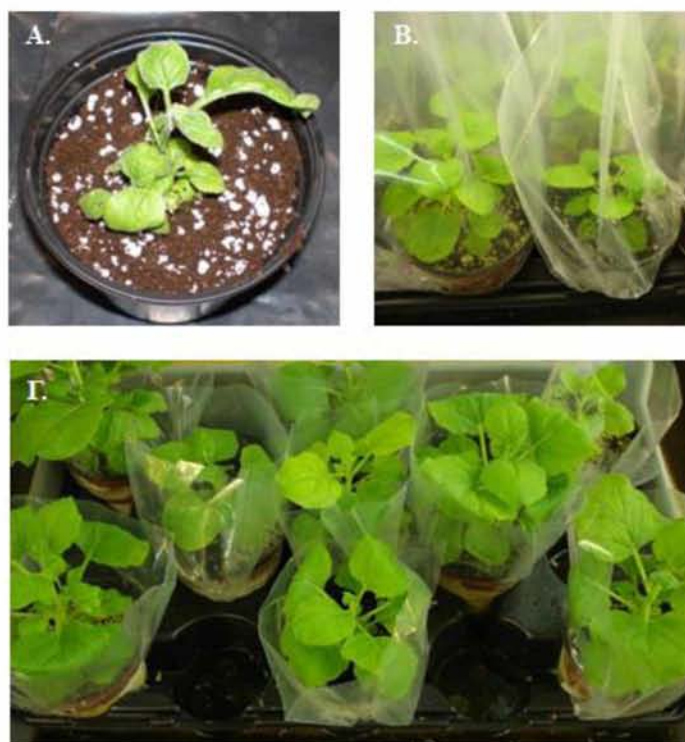


Εικόνα. 3.1: Επιλογή σπόρων T₂ γενιάς του είδους *Nicotiana benthamiana* σε θρεπτικό μέσο επιλογής που περιέχει υγρομυκίνη (30 mg/l). **A, B, Γ.** Διαγονιδιακά φυτά T₂ γενιάς που εκφράζουν ενδογενώς την πρωτεΐνη SP/HrpZ_{P_{sph} (**A, B:** ομοζύγωτες σειρές, **Γ:** ετεροζύγωτη σειρά), **Δ.** Νεαρά φυτά άγριου τύπου (wt) που δεν αναπτύσσονται υπό την πίεση επιλογής. Η ανθεκτικότητα στην υγρομυκίνη επιβεβαιώνει τη διαγονιδιακή φύση των T₂ σειρών.}

Η παρατηρηθείσα ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό επιλογής επιβεβαιώνει τη διαγονιδιακή φύση των T_2 φυτών ενώ παράλληλα, όπως αναμενόταν, οι αναλογίες διάσπασης ακολούθησαν τη Μενδελιανή κληρονομικότητα που χαρακτηρίζει τα μονογονιδιακά γνωρίσματα. Η αναλογία αυτή είναι η αναμενόμενη στην περίπτωση που το διαγονίδιο έχει ενσωματωθεί σε ένα αντίγραφο.

Από τις 20 διαγονιδιακές σειρές που ελέγχθηκαν, διαπιστώθηκε η ομοζύγωτη κατάσταση του διαγονιδίου *SP/hrpZ_{Spsh}* σε 7 από αυτές και συνεπώς, αξιοποιήθηκαν οι συγκεκριμένες για τη δημιουργία ομοζύγων T_3 οικογενειών από σπόρο αυτογονιμοποίησης. Η T_3 γενιά των διαγονιδιακών φυτών θεωρείται ως η πλέον κατάλληλη για να αξιολογηθεί η επίδραση της έκφρασης των υπό μελέτη διαγονιδίων στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας.

Τα φυτά των επιλεγμένων σειρών αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο επιλογής που περιείχε υδρομυκίνη και ακολούθησε σκληραγώγηση αυτών με σταδιακή μείωση της υγρασίας (Εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2: Αναγεννημένα φυτά σε στάδιο σκληραγώγησης και εγκλιματισμού. **A.** Μεταφορά νεαρού φυτού σε χώμα, **B.** Κάλυψη φυτών ιστοκαλλιέργειας με σακούλες, **Γ.** Σταδιακή αφαίρεση της κάλυψης προς εγκλιματισμό των φυτών σε συνθήκες περιβάλλοντος.

Οι σπόροι αυτογονιμοποίησης (T_3) των επιλεγμένων - ομοζύγων σειρών (Πίνακας 3.1) αναπτύχθηκαν στο θερμοκήπιο και ακολούθησε μεταφύτευσή τους, με σκοπό τη μεμονωμένη ανάπτυξή τους για τις επακόλουθες διαδικασίες μόλυνσης και αξιολόγησης της ανθεκτικότητας σε παθογόνους μικροοργανισμούς.

Πίνακας 3.1: Αριθμός διαγονιδιακών φυτών T_3 γενιάς και φυτών-μαρτύρων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας.

Αριθμός διαγονιδιακών σειρών	Τύπος διαγονιδίου	Αριθμός φυτών (T_3)
5	<i>SP/HrpZ_{P_{sph}}</i>	60
WT (θετικοί μάρτυρες)	---	10
WT (αρνητικοί μάρτυρες)	---	10
Σύνολο		80

Σε συμφωνία με αποτελέσματα προηγούμενων μελετών (Pavli et al., 2011; 2012), όλα τα φυτά (T_2 , T_3) είχαν φυσιολογικό φαινότυπο και δεν παρουσίασαν νεκρωτικά ή άλλου τύπου συμπτώματα λόγω της ενδογενούς έκφρασης της χαρπίνης *SP/HrpZ_{P_{sph}}*. Παρόλα αυτά, τα διαγονιδιακά φυτά χαρακτηρίζονταν από αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης και υψηλή ευρωστία συγκριτικά με τα φυτά αγρίου τύπου (Εικόνα 3.3).

Για τις ανάγκες του πειράματος συμπεριλήφθηκαν ως μάρτυρες και φυτά αγρίου τύπου.



Εικόνα 3.3: Επίδραση της ενδογενούς έκφρασης της χαρπίνης *SP/HrpZ_{P_{sph}}* στην ανάπτυξη των φυτών του είδους *N. benthamiana*. **A.** Μη-μετασχηματισμένο φυτό (αγρίου τύπου). **B.** Διαγονιδιακό φυτό ίδιας ηλικίας που εκφράζει την πρωτεΐνη *SP/HrpZ_{P_{sph}}*.

3.2 Αξιολόγηση των Διαγονιδιακών Φυτών

3.2.1 Έλεγχος της παρουσίας του διαγονιδίου *SP/hrpZ_{P_{sph}}*

Τα μετασχηματισμένα φυτά (T_3) ελέγχθηκαν για την ένθεση του διαγονιδίου *SP/hrpZ_{P_{sph}}* και την απουσία του γονιδίου *virG* του *A. tumefaciens*. Για το σκοπό αυτό, αρχικά απομονώθηκε γονιδιωματικό DNA από τα μετασχηματισμένα φυτά και ακολούθησε αντίδραση πολλαπλής PCR (multiplex PCR).

Η επιτυχής ένθεση του διαγονιδίου επιβεβαιώθηκε σε όλα τα φυτά που εξετάστηκαν, με την ενίσχυση προϊόντων αναμενόμενου μεγέθους για το διαγονίδιο *hrpZ_{P_{sph}}* (995 bp) και την ταυτόχρονη αδυναμία ενίσχυσης της περιοχής *virG* (590 bp). Τα ευρήματα αυτά αποκλείουν το ενδεχόμενο επιμόλυνσης με το αγροβακτήριο και ταυτόχρονα επιβεβαιώνουν τον επιτυχή μετασχηματισμό (Εικόνα 3.4).



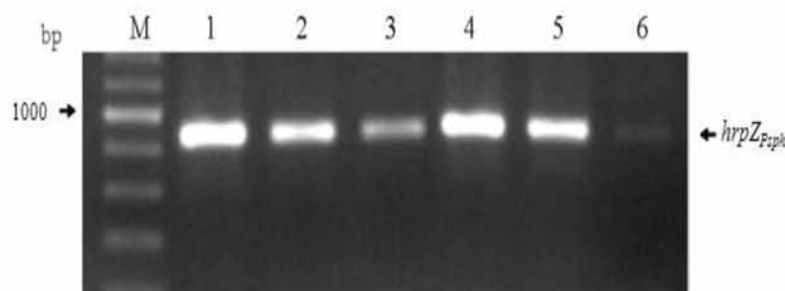
Εικόνα. 3.4: Προϊόντα ενίσχυσης πολλαπλής PCR σε μετασχηματισμένα φυτά του είδους *N. benthamiana*. M: Marker (bp) (Gene Ruler Ladder mix, Fermentas). 1,2,3: Μετασχηματισμένα φυτά (T_3 γενιά) που φέρουν το διαγονίδιο *SP/hrpZ_{P_{sph}}* (995 bp). 4: Βακτηριακά κύτταρα (*A. tumefaciens*, C58C1) μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο pBin.Tx.Hyg-*SP/HrpZ_{P_{sph}}*. 5: Μη-μετασχηματισμένο φυτό. Το προϊόν ενίσχυσης (590 bp) που αντιστοιχεί στο γονίδιο *virG* του *A. tumefaciens* ανιχνεύθηκε μόνο στα βακτηριακά κύτταρα, υποδεικνύοντας την απουσία αλληλουχιών του Ti πλασμιδίου.

3.2.2 Έλεγχος της έκφρασης του διαγονιδίου *SP/hrpZ_{P_{sph}}*

Τα μετασχηματισμένα φυτά (T_3) ελέγχθηκαν για την έκφραση του διαγονιδίου *SP/hrpZ_{P_{sph}}*. Για το σκοπό αυτό, αρχικά απομονώθηκε ολικό RNA από τα μετασχηματισμένα φυτά και ακολούθησε αντίστροφη μεταγραφή για τη σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αντίδραση RT-PCR, χρησιμοποιώντας εξειδικευμένους εκκινητές για το διαγονίδιο *SP/hrpZ_{P_{sph}}*.

Η έκφραση του διαγονιδίου *SP/hrpZ_{P_{sph}}* επιβεβαιώθηκε σε όλα τα δείγματα φυτών που εξετάστηκαν με την ενίσχυση προϊόντων αναμενόμενου μεγέθους για το διαγονίδιο

SP/hrpZ_{P_{sph}} (995 bp). Ωστόσο, οι υπό μελέτη διαγονιδιακές σειρές χαρακτηρίζονταν από διαφορετικά επίπεδα έκφρασης του διαγονιδίου (Εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.5: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων αντίστροφης μεταγραφής ακολουθούμενης από PCR (RT-PCR). 1-6: ενίσχυση του διαγονιδίου *hrpZ* (995 bp) σε διαγονιδιακά φυτά που έχουν μετασχηματιστεί με το πλασμίδιο pBin.Hyg.Tx-SP/*hrpZ_{P_{sph}}*. Ladder: Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas).

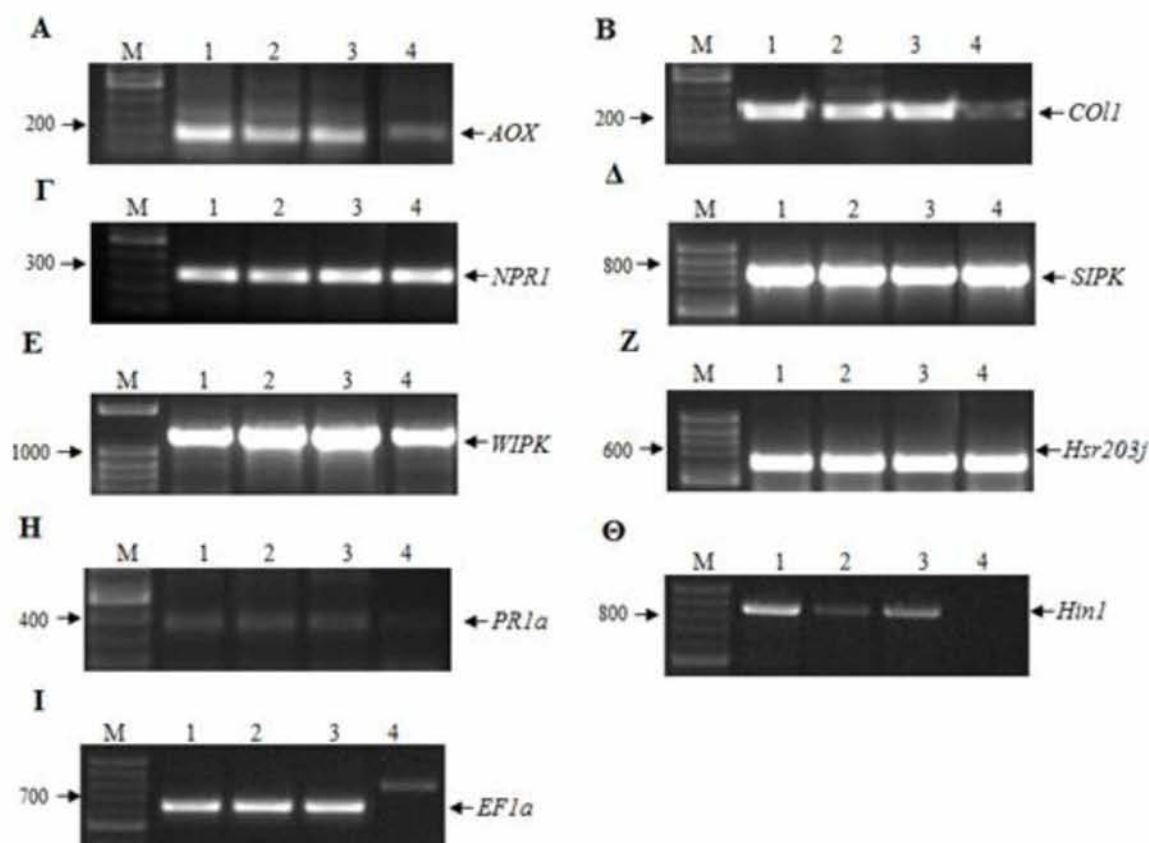
3.2.3 Έλεγχος της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται σε βιοχημικά μονοπάτια άμυνας των φυτών

Προηγούμενες έρευνες έχουν δείξει πως οι χαρπίνες ενεργοποιούν ποικίλα μονοπάτια άμυνας των φυτών. Παράλληλα, έχει αναφερθεί ότι επάγονται διαφορετικά γονίδια άμυνας, είτε λόγω της έκφρασης διαφορετικών χαρπινών είτε λόγω του διαφορετικού τρόπου εφαρμογής τους με ενδογενή έκφραση ή εξωτερική εφαρμογή. Με σκοπό να καθοριστεί αν η έκφραση της χαρπίνης επάγει αμυντικούς μηχανισμούς, εξετάστηκε η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών, με τη χρήση της αντίδρασης RT-PCR.

Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων *hin1*, *SIPK*, *WIPK* και *hsr203J*, τα οποία σχετίζονται με την αντίδραση υπερευαισθησίας (Hypersensitive response, HR), καθώς και των γονιδίων *AOX*, *CoII*, *NPR1* και *PR1a*, τα οποία εμπλέκονται στη σύνθεση ενεργών μορφών οξυγόνου (AOS), ιασμονικού οξέος (JA), σαλικυλικού οξέος (SA) και πρωτεϊνών παθογένεσης (PR), αντίστοιχα.

Το επίπεδο της έκφρασης των γονιδίων *SIPK*, *WIPK*, *NPR1* και *hsr203J* ήταν το ίδιο σε όλα τα T₃ φυτά που εξετάστηκαν σε σύγκριση με αυτό των μη μετασχηματισμένων φυτών. Αντίθετα, τα προϊόντα ενίσχυσης των γονιδίων *AOX*, *COII* και *PR1a* ήταν ελαφρά υψηλότερα στα φυτά που εκφράζουν τη χαρπίνη συγκριτικά με τα φυτά μάρτυρες (Εικόνα 3.6). Τέλος, η έκφραση του γονιδίου *hin1* ανιχνεύθηκε αποκλειστικά στα φυτά που εκφράζουν τη χαρπίνη HrpZ_{P_{sph}}.

Προκειμένου να αποκλειστεί το ενδεχόμενο ενίσχυσης των ακολουθιών αυτών λόγω μόλυνσης από γονιδιωματικό DNA χρησιμοποιήθηκε, ως αρχικός μάρτυρας, το σταθερά εκφραζόμενο γονίδιο *EF1a* (elongation factor 1-alpha-like). Το αμπλικόνιο *EF1a* που λήφθηκε από γονιδιωματικό DNA είναι μεγαλύτερου μεγέθους λόγω της ύπαρξης ενός ιντρονίου σε σύγκριση με το μεταγραφόμενο τμήμα που παράχθηκε από την αντίδραση RT-PCR από απομονώσεις mRNA φύλλων (Εικόνα 3.6).



Εικόνα 3.6: Επαγωγή της έκφρασης γονιδίων άμυνας σε διαγονιδιακά φυτά του είδους *N. benthamiana* που εκφράζουν τη χαρπίνη *SP/hrpZ_{P_{sph}}* συγκριτικά με φυτά αγρίου τύπου. **A.-Θ.** M: Δείκτης σε bp (Gene Ruler Ladder mix, Fermentas). 1,2,3: Φυτά μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο *pBin.Hyg.Tx-SP/hrpZ_{P_{sph}}*. Παρατηρείται έκφραση των γονιδίων *AOX*, *ColI*, *NPR1*, *SIPK*, *WIPK*, *hsr203j*, *PR1a* και *hin1*, που αντιστοιχούν σε αμπλικόνια μεγέθους 160, 228, 273, 755, 1158, 596, 335, 847 bp αντίστοιχα. 4: Μη διαγονιδιακό φυτό. Παρατηρείται έκφραση των γονιδίων *AOX*, *ColI*, *NPR1*, *SIPK*, *WIPK*, *hsr203j* και *PR1a*, ενώ το γονίδιο *hin1* δεν εκφράζεται. **I.** M: Δείκτης σε bp (Gene Ruler Ladder mix, Fermentas). 1,2,3: Φυτά που εκφράζουν το γονίδιο *SP/hrpZ_{P_{sph}}*. Παρατηρείται έκφραση του γονιδίου *EF1a* (669 bp). 4: Γονιδιωματικό DNA που χρησιμοποιείται ως πρότυπο με σκοπό να αναδείξει πιθανή μόλυνση με γονιδιωματικό DNA. Λόγω της παρουσίας ιντρονίου, το αμπλικόνιο που αντιστοιχεί στο γονίδιο *EF1a* είναι μεγαλύτερου μεγέθους σε σύγκριση με το μεταγραφόμενο τμήμα που παράχθηκε από την RT-PCR.

3.3 Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας των φυτών που εκφράζουν το γονίδιο *SP/hrpZ_{Psph}*

Προκειμένου να διερευνηθεί η ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι παθογόνων μικροοργανισμών, πραγματοποιήθηκαν πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας έναντι του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC3000) και του ιού του μωσαϊκού του καπνού (*Tobacco mosaic virus*, TMV). Για το σκοπό αυτό, τα φυτά T₃ γενιάς αρχικά μολύνθηκαν με τα παθογόνα που προαναφέρθηκαν, και στη συνέχεια αξιολογήθηκε η απόκρισή τους, σε σύγκριση με φυτά αγρίου τύπου. Η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας έγινε τόσο σε μακροσκοπικό επίπεδο, μέσω παρατήρησης και καταγραφής των συμπτωμάτων, όσο και με μεθόδους ποσοτικοποίησης του παθογόνου.

3.3.1 Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας στον ιό του μωσαϊκού του καπνού (*Tobacco mosaic virus*, TMV)

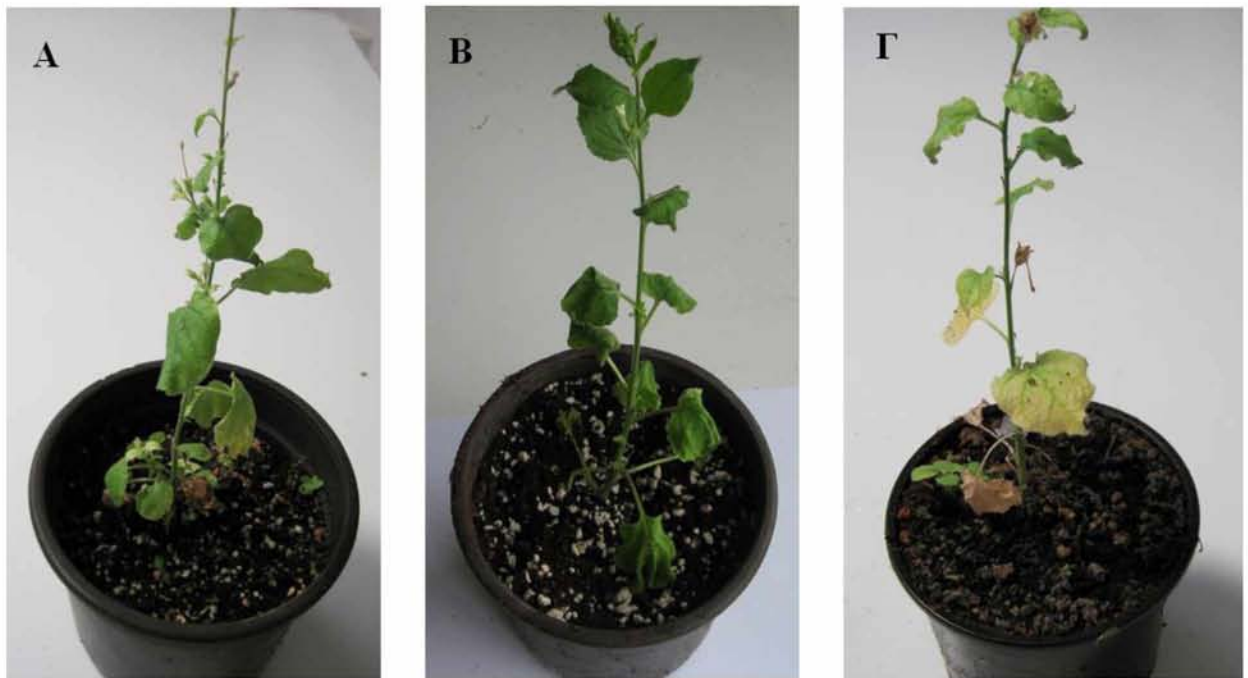
Προκειμένου να ελεγχθεί η επίδραση του γονιδίου *SP/hrpZ_{Psph}* στα διαγονιδιακά φυτά (T₃) του είδους *Nicotiana benthamiana*, αναφορικά με την ιολογική ασθένεια του μωσαϊκού του καπνού, επιλέχθηκαν 6 φυτά από 5 διαφορετικές διαγονιδιακές σειρές και μολύνθηκαν με τον ιό.

Στο πείραμα συμπεριλήφθηκαν θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες για την εξασφάλιση της αξιοπιστίας των μετρήσεων αξιολόγησης της ανθεκτικότητας. Μη-μετασχηματισμένα φυτά (αγρίου τύπου) που μολύνθηκαν με το βακτήριο εξυπηρέτησαν ως θετικοί μάρτυρες (5), ενώ αγρίου τύπου φυτά που δεν υπέστησαν καμία μεταχείριση συμπεριλήφθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες (5). Συνολικά αξιολογήθηκαν 30 διαγονιδιακά φυτά και 10 φυτά αγρίου τύπου.

Τα προκαταρκτικά πειράματα καταπονήσεων με τον ιό του μωσαϊκού του καπνού (*Tobacco mosaic virus*, TMV) υποδεικνύουν μικρή διαφοροποίηση στην εκδήλωση συμπτωμάτων των διαγονιδιακών φυτών συγκριτικά με τα φυτά αγρίου τύπου.

Όσον αφορά τα φυτά αγρίου τύπου του είδους *Nicotiana benthamiana*, που αξιοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες, τα πρώτα συμπτώματα άρχισαν να εμφανίζονται περίπου 7 ημέρες μετά τη μηχανική μόλυνση με τον ιό. Ειδικότερα, αυτά περιλαμβάνουν αρχικά μαρασμό, χλώρωση και συστροφή κατά κύριο λόγο των φύλλων που δέχθηκαν τον εμβολιασμό. Στη συνέχεια, τα συμπτώματα μαρασμού των φυτών και συστροφής των φύλλων ήταν περισσότερο γενικευμένα και καταλάμβαναν σχεδόν ολόκληρο το φυτό.

Στο χρονικό διάστημα των 14 ημερών μετά τη μηχανική μόλυνση των φυτών, παρατηρήθηκε μια εικόνα χλώρωσης και καταπόνησης του φυτού, ενώ παράλληλα σημειώθηκε η ανάπτυξη νεκρωτικών κηλίδων και περιορισμένης έκτασης κύρτωσης του στελέχους, συμπτώματα τυπικά της μόλυνσης του ιού του μωσαϊκού του καπνού (*Tobacco mosaic virus*, TMV) (Εικόνες 3.7, 3.9).

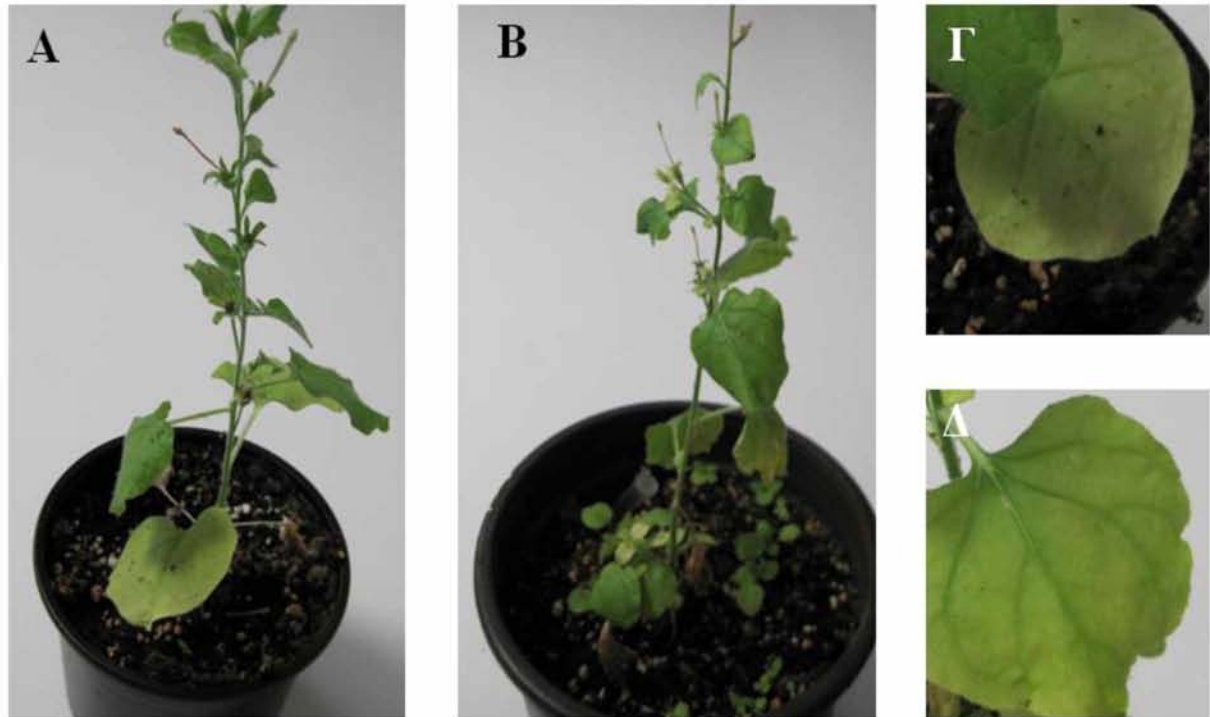


Εικόνα 3.7: Συμπτώματα του ιού του μωσαϊκού του καπνού σε φυτά αγρίου τύπου του είδους *N. benthamiana*. **A.** Φυτό με συμπτώματα μααρασμού, χλώρωσης και συστροφής των φύλλων (10 ημέρες μετά τη μόλυνση με τον ιό) **B.** Φυτό με συμπτώματα γενικευμένου μααρασμού και συστροφής των φύλλων (10 ημέρες μετά τη μόλυνση με τον ιό) **Γ.** Φυτό με συμπτώματα εκτεταμένης χλώρωσης (20 ημέρες μετά τη μόλυνση με τον ιό).

Αναφορικά με τα διαγονιδιακά φυτά που εκφράζουν το γονίδιο *SP/hrpZ_{P_{sph}}*, η συμπτωματολογία υπήρξε περισσότερο ήπια. Συγκεκριμένα, τα πρώτα συμπτώματα της ασθένειας καταγράφηκαν περίπου 10 ημέρες μετά τη μόλυνση, υποδεικνύοντας ότι η έκφραση της πρωτεΐνης πιθανώς σχετίζεται με μια ελαφρά καθυστέρηση στην ανάπτυξη συμπτωμάτων.

Τα συμπτώματα που καταγράφηκαν περιλαμβάνουν αρχικά μια ήπια χλώρωση κυρίως των φύλλων δέχθηκαν τη μόλυνση, η οποία μετέπειτα γενικεύεται και καταλαμβάνει ολόκληρο το φυτό. Επιπρόσθετα, τα φυτά παρουσίασαν συμπτώματα συστροφής κυρίως των κατώτερων φύλλων. Θα πρέπει, ωστόσο, να σημειωθεί πως συμπτώματα μααρασμού μέρους ή ολόκληρων

των φυτών δεν παρατηρήθηκαν και τα υπό μελέτη φυτά χαρακτηρίστηκαν από ηπιότερη συμπτωματολογία καθώς και σχετική ευρωστία συγκριτικά με τα φυτά αγρίου τύπου (Εικόνες 3.8, 3.9).

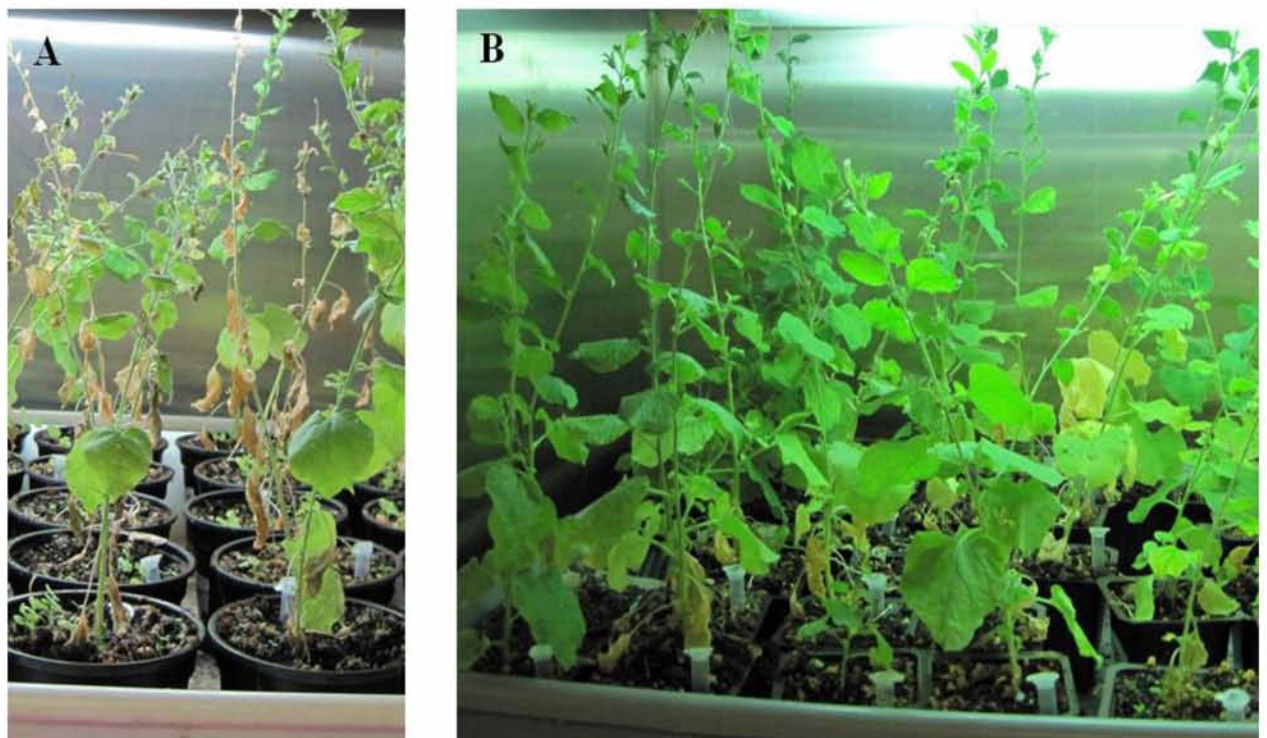


Εικόνα 3.8: Συμπτώματα του ιού του μωσαϊκού του καπνού (*Tobacco mosaic virus*, TMV) σε διαγονιδιακά φυτά του είδους *N. benthamiana* που εκφράζουν το γονίδιο *SP/hrpZ_{psph}*. **Α.** Φυτό με ήπια συμπτώματα χλώρωσης των φύλλων (10 ημέρες μετά τη μόλυνση με τον ιό) **Β.** Φυτό με συμπτώματα χλώρωσης και συστροφής στα κατώτερα φύλλα (20 ημέρες μετά τη μόλυνση με τον ιό) **Γ, Δ.** Συμπτώματα χλώρωσης των φύλλων.

Σύμφωνα με την ποσοτικοποίηση του ιικού φορτίου μέσω ανοσοανίχνευσης DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) στις 10 ημέρες μετά τη μόλυνση, τα φυτά αγρίου τύπου που συμπεριλήφθηκαν ως θετικοί μάρτυρες (5 φυτά) εμφανίζονταν ως θετικά στη μόλυνση, με μέση απορρόφηση που κυμαίνονταν στα $OD_{405}=0.602$, ενώ στις 20 ημέρες τα συγκεκριμένα φυτά παρουσίασαν αύξηση του ιικού φορτίου, μιας και η μέση τιμή απορρόφησης κυμάνθηκε περίπου στα $OD_{405}=0.957$.

Αντίθετα, τα φυτά που συμπεριλήφθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες (5 φυτά) εμφανίζονταν ως αρνητικά στη μόλυνση τόσο στις 10 ημέρες (μ.ο. $OD_{405}=0.141$) όσο και στις 20 ημέρες (μ.ο. $OD_{405}=116$) μετά τη μηχανική μόλυνση με τον ιό.

Αναφορικά με τα διαγονιδιακά φυτά που εκφράζουν το γονίδιο *SP/hrpZ_{P_{sph}}* (30 φυτά), τα ευρήματα υποδηλώνουν μια ηπιότερη εξέλιξη της ασθένειας, καθότι στις 10 ημέρες μετά τη μόλυνση με τον ιό, σχεδόν όλα τα φυτά παρουσίασαν τιμές ιικού φορτίου που οριακά λαμβάνονταν ως θετικές (μ.ο. $OD_{405}=0.337$) ή ήταν σημαντικά μειωμένες σε σύγκριση με τις τιμές του μάρτυρα. Στις 20 ημέρες μετά τη μόλυνση, το σύνολο των φυτών αυτών εμφανίστηκαν θετικά στη μόλυνση με τιμές ιικού φορτίου ωστόσο χαμηλότερες συγκριτικά με αυτές των φυτών-μαρτύρων (μ.ο. $OD_{405}=0.632$) (Πίνακας 3.2).



Εικόνα 3.9: Φυτά αγρίου τύπου και διαγονιδιακά φυτά του είδους *N. benthamiana* που εκφράζουν το γονίδιο *SP/hrpZ_{P_{sph}}* με συμπτώματα του ιού του μωσαϊκού του καπνού (20 ημέρες μετά τη μόλυνση με τον ιό). **A.** Φυτά αγρίου τύπου με συμπτώματα χλώρωσης, συστρώφης και νέκρωσης των φύλλων **B.** Διαγονιδιακά φυτά με ήπια συμπτώματα χλώρωσης και νέκρωσης των φύλλων.

Πίνακας 3.2: Μέσοι όροι των τιμών DAS-ELISA σε πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας έναντι του ιού του μωσαϊκού του καπνού (*Tobacco mosaic virus*, TMV). Τα δεδομένα αφορούν σε μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας στα 405nm, 10 και 20 ημέρες (ημμ) μετά τη μηχανική μόλυνση με τον ιό.

Κατηγορία φυτών	Αριθμός φυτών	Μέσος Όρος Τιμών ELISA (OD ₄₀₅)	
		10 ημμ	20 ημμ
SP/hrpZ _{PspH}	30	0.337(+)*	0.632(+)
Θετικός Μάρτυρας**	5	0.602(+)	0.957(+)
Αρνητικός Μάρτυρας***	5	0.141(-)*	0.116(-)

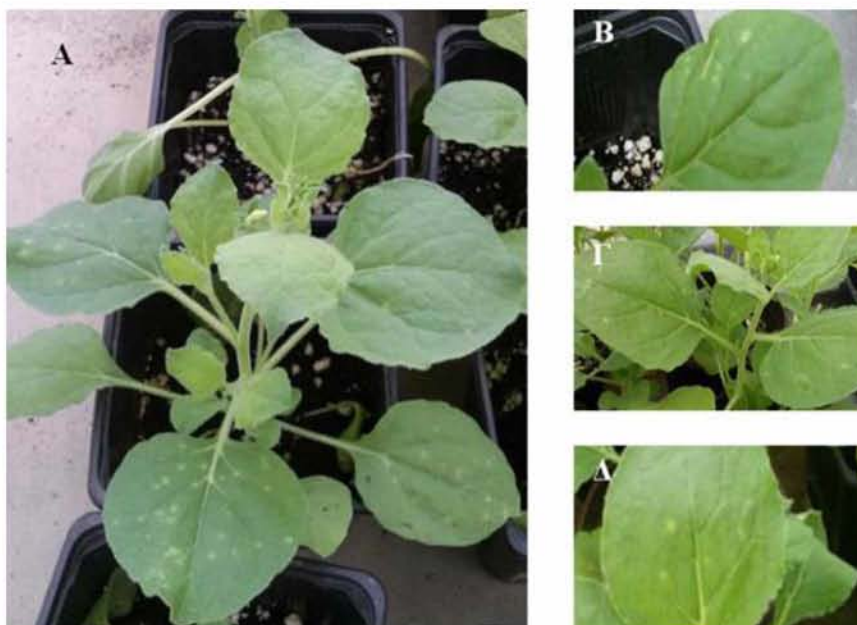
* (-) Τιμή ενδεικτική της απουσίας του ιού (μέση τιμή αρνητικού μάρτυρα κит: 0.096-0.112), (+)Τιμή ενδεικτική της παρουσίας του ιού, ** Μέσος όρος φυτών αγρίου τύπου που μολύνθηκαν με τον ιό, *** Μέσος όρος φυτών αγρίου τύπου που δεν υπέστησαν καμία μεταχείριση

3.3.2 Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας στο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

Στο πλαίσιο αξιολόγησης της επίδρασης του γονιδίου SP/hrpZ_{PspH} στα διαγονιδιακά φυτά (T₃) του είδους *Nicotiana benthamiana*, αναφορικά με την ασθένεια της βακτηριακής κηλίδωσης του καπνού, επιλέχθηκαν 6 φυτά από 5 διαφορετικές διαγονιδιακές σειρές και μολύνθηκαν με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC3000).

Στο πείραμα συμπεριλήφθηκαν θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες για την εξασφάλιση της αξιοπιστίας των μετρήσεων αξιολόγησης της ανθεκτικότητας. Μη-μετασχηματισμένα φυτά (αγρίου τύπου) που μολύνθηκαν με το βακτήριο εξυπηρέτησαν ως θετικοί μάρτυρες (5), ενώ αγρίου τύπου φυτά που δεν υπέστησαν καμία μεταχείριση συμπεριλήφθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες (5). Συνολικά αξιολογήθηκαν 30 διαγονιδιακά φυτά και 10 φυτά αγρίου τύπου.

Τα προκαταρκτικά αποτελέσματα των πειραμάτων καταδεικνύουν την ύπαρξη διαφορών στην απόκριση των διαγονιδιακών φυτών που εκφράζουν το γονίδιο SP/hrpZ_{PspH} συγκριτικά με τα φυτά αγρίου τύπου. Όσον αφορά στα φυτά αγρίου τύπου στο χρονικό διάστημα 4 ημερών μετά τη μηχανική μόλυνση, το βακτήριο προκάλεσε την ανάπτυξη μικρού μεγέθους χλωρωτικών κηλίδων στα φύλλα, οι οποίες καλύπτονταν περιφερειακά από μια κίτρινη χλωρωτική άλω (δακτύλιος), καθώς και χλώρωση του ελάσματος των φύλλων (Εικόνα 3.10).



Εικόνα 3.10: Συμπτώματα της βακτηριακής κηλίδωσης, 4 ημέρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC3000) σε φυτά αγρίου τύπου του είδους *N. benthamiana*. **A.** Φυτό με συμπτώματα χλωρωτικών κηλίδων **B.** Φυτό με εμφανείς χλωρωτικές κηλίδες οι οποίες περιβάλλονται από χλωρωτική άλω **Γ. Δ.** Συμπτώματα χλώρωσης και χλωρωτικών κηλίδων.

Αντίθετα, η συμπτωματολογία των διαγονιδιακών φυτών που εκφράζουν το γονίδιο *SP/hrpZ_{P_{sph}}*, στις 4 ημέρες μετά τη μόλυνση, περιελάμβανε ήπια χλώρωση του ελάσματος των φύλλων, καθώς και περιορισμένο αριθμό χλωρωτικών κηλίδων. Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα φυτά της κατηγορίας αυτής ιδιαίτερα στα φύλλα που δέχθηκαν τον εμβολιασμό, εμφανίστηκαν νεκρωτικές κηλίδες που περιβάλλονταν από χλωρωτική άλω (Εικόνα 3.11).

Οι κηλίδες αυτές πιθανώς προκύπτουν ως επακόλουθο πρόκλησης της αντίδρασης υπερευαισθησίας (Hypersensitive response, HR) η οποία, όπως είναι γνωστό, θα είχε ως αποτέλεσμα την πρόληψη δημιουργίας αποικιών, πολλαπλασιασμού και απορρόφησης θρεπτικών στοιχείων του παθογόνου από το φυτό ξενιστή. Κατά συνέπεια, ο παθογόνος μικροοργανισμός θα έδειχνε αδυναμία επέκτασης στο ανώτερο τμήμα του φυτού. Τέλος, είναι αξιοσημείωτο ότι τα υπό μελέτη διαγονιδιακά φυτά χαρακτηρίζονταν από μια ορατή ευρωστία και αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου.



Εικόνα 3.11: Συμπτώματα της βακτηριακής κηλίδωσης, 4 ημέρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC3000) σε διαγονιδιακά φυτά του είδους *N. benthamiana* που εκφράζουν το γονίδιο *SP/hrpZ_{Psph}*. **Α.** Διαγονιδιακά φυτά με συμπτώματα χλώρωσης των φύλλων **Β.** Διαγονιδιακά φυτά με ήπια συμπτώματα χλωρωτικών κηλίδων **Γ.** Διαγονιδιακό φυτό με συμπτώματα χλωρωτικών και νεκρωτικών κηλίδων **Δ.** Φύλλο με συμπτώματα νεκρωτικής κηλίδας ως αποτέλεσμα επαγωγής της αντίδρασης υπερευαισθησίας (Hypersensitive response, HR).

4. Συζήτηση

Η συνεξέλιξη μεταξύ φυτών-ξενιστών και φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών αφορά μια συνεχή μάχη αλληλεπίδρασης, όπου η εξέλιξη των μικροοργανισμών περιλαμβάνει, μεταξύ άλλων, την κατοχή πρωτεϊνών-τελεστών που μεταβάλλουν προς όφελός τους την πρωτογενή και δευτερογενή άμυνα του ξενιστή (για άρθρο ανασκόπησης βλέπε, de Wit, 2007). Σε απάντηση των ανωτέρω, τα φυτά έχουν αναπτύξει μηχανισμούς αναγνώρισης των πρωτεϊνών-τελεστών και επακόλουθης ενεργοποίησης διαδοχικών επιπέδων άμυνας, ώστε να καθίσταται ικανή η τοπική και διασυστηματική άμυνα έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών.

Είναι ευρέως γνωστό ότι οι βακτηριακής προέλευσης χαρπίνες, κατά την εξωγενή εφαρμογή τους ή την ενδογενή έκφρασή τους σε φυτά, επάγουν μηχανισμούς άμυνας, προσδίδοντας ανθεκτικότητα σε βιοτικούς ή/και αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης. Η ανακάλυψη ότι οι χαρπίνες, κατά την εξωγενή ή ενδογενή έκφρασή τους, ενεργοποιούν την αντίδραση υπερευαισθησίας (Hypersensitive response, HR) ή/και επάγουν μηχανισμούς άμυνας απουσία νέκρωσης, οδήγησε στην αξιοποίησή τους ως φυτοπροστατευτικές ουσίες έναντι βακτηρίων, μυκήτων, ιών, (Strobel et al., 1996; Dong et al., 1999; Li and Fan, 1999; Peng et al., 2003; 2004; Takamura et al., 2004; Ren et al., 2006a; 2006b; Shao et al., 2008; Wang et al., 2008; Pavli et al., 2011), εντόμων (Dong et al., 2004), αλλά και αβιοτικών καταπονήσεων (Dong et al., 2005; Zhang et al., 2007; 2011).

Σε προηγούμενες μελέτες, έχει αποδειχθεί ότι η χαρπίνη HrpZ_{P_{sph}}, που προέρχεται από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, προσδίδει ανθεκτικότητα στον ιό *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV), που προκαλεί την ασθένεια της ριζομανίας των ζαχαροτεύτλων. Ειδικότερα, η ενδογενής έκφραση της χαρπίνης HrpZ_{P_{sph}} στην εκκρινόμενη μορφή της (SP/HrpZ_{P_{sph}}), ώστε να κατευθύνεται η συσσώρευση της πρωτεΐνης εξωκυτταρικά (Ταμπακάκη, 1999, σελ. 188), αποδείχθηκε ότι προσδίδει ανθεκτικότητα στη ριζομανία τόσο σε διαγονιδιακά φυτά του είδους *Nicotiana benthamiana*, όσο και σε διαγονιδιακές ρίζες ζαχαρότευτλου (Pavli et al., 2011; 2012). Μάλιστα, είναι αξιοσημείωτο ότι φυτά που εκφράζουν την κανονική μορφή της χαρπίνης (HrpZ_{P_{sph}}), όπου η πρωτεΐνη παράγεται ενδοκυτταρικά, παρουσίασαν διαφορετικό φαινότυπο αναφορικά με την ανθεκτικότητα στην ασθένεια της ριζομανίας. Ειδικότερα, τα φυτά που εκφράζουν τη HrpZ_{P_{sph}} ήταν ευαίσθητα στον ιό της ριζομανίας (*Beet necrotic yellow vein virus*, BNYVV) και η ανάπτυξη συμπτωμάτων ήταν παρόμοια με εκείνη των φυτών άγριου τύπου. Τα

αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν ο φαινότυπος ανθεκτικότητας σχετίζεται με την συσσώρευση της χαρπίνης εξωκυτταρικά.

Στο πλαίσιο αυτό, στόχο της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η διερεύνηση της επίδρασης της χαρπίνης SP/HrpZ_{Psph} ως προς την επαγωγή ανθεκτικότητας σε φυτά του είδους *N. benthamiana*. Ειδικότερα, στόχος της διατριβής ήταν η μελέτη της επίδρασης της χαρπίνης SP/HrpZ_{Psph} στη βασική άμυνα των φυτών, καθώς και η δυνατότητα αξιοποίησής της σε βελτιωτικές διαδικασίες που αποσκοπούν στην επίτευξη ευρείας ανθεκτικότητας έναντι βιοτικών καταπονήσεων.

Για το σκοπό αυτό, αρχικά πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση των διαθέσιμων διαγονιδιακών σειρών (T₂) ως προς την ομοζύγωτη/ετεροζύγωτη κατάσταση του διαγονιδίου SP/hrpZ_{Psph} και ακολούθησε ανάπτυξη αποκλειστικά των ομοζύγων σειρών και παραγωγή διαγονιδιακών φυτών T₃ γενιάς. Θα πρέπει να αναφερθεί πως η T₃ θεωρείται ως η πλέον κατάλληλη γενιά για τη μελέτη της επίδρασης διαγονιδίων γενικότερα, αλλά και την αξιολόγηση της ανθεκτικότητας ειδικότερα.

Παρά το γεγονός ότι τα φυτά χαρακτηρίστηκαν από φυσιολογικό φαινότυπο και απουσία νεκρωτικών ή άλλων συμπτωμάτων, λόγω της έκφρασης της χαρπίνης, χαρακτηρίζονταν από εμφανώς αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης και ευρωστία. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες έρευνες, όπου επίσης σημειώθηκε ανάλογη προώθηση της ανάπτυξης των φυτών που εκφράζουν την πρωτεΐνη SP/HrpZ_{Psph} (Pavli et al., 2011; 2012). Η προώθηση της αύξησης λόγω της εξωγενούς εφαρμογής ή ενδογενούς παραγωγής χαρπινών έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία και για προερχόμενες από άλλα βακτήρια χαρπίνες. Μάλιστα, η ρύθμιση της αύξησης, τόσο κατά την εξωγενή εφαρμογή χαρπινών (Dong et al., 2004; Ren et al., 2006a, Wu et al., 2007; Chen et al., 2008) όσο και κατά την διαγονιδιακή τους έκφραση (Jang et al., 2006; Ren et al., 2006b; Huo et al., 2010), εικάζεται ότι οφείλεται σε βελτιωμένη απορρόφηση θρεπτικών στοιχείων και αυξημένο ρυθμό φωτοσύνθεσης (Kim and Beer, 2000; Jang et al., 2006; Oh and Beer, 2007).

Ταυτόχρονα, η απουσία νεκρωτικών ή άλλου τύπου συμπτωμάτων στα φυτά που εκφράζουν χαρπίνη αναφέρεται και σε προηγούμενες έρευνες που καταδεικνύουν το φυσιολογικό φαινότυπο των φυτών αυτών, σε αντίθεση με την εξωγενή εφαρμογή χαρπινών που σε καθαρή μορφή επάγει κυτταρικό θάνατο. Η έλλειψη νεκρωτικού φαινοτύπου έχει αποδοθεί στο γεγονός ότι ακόμη και όταν οι χαρπίνες παράγονται *in planta* σε επαρκή ποσότητα και

βιολογικά ενεργή μορφή, η δράση τους είναι εξωκυτταρική και δεν μπορεί να εκδηλωθεί μέσα στα φυτικά κύτταρα (Ταμπακάκη, 1999, σελ. 107).

Προκειμένου να αξιολογηθούν τα T_3 διαγονιδιακά φυτά, πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος της ένθεσης και έκφρασης του διαγονιδίου *SP/hrpZ_{Psph}*. Η επιτυχής ενσωμάτωση του διαγονιδίου, καθώς και η ταυτόχρονη απουσία αλληλουχιών DNA του αγροβακτηρίου επιβεβαιώθηκε σε όλα τα φυτά που εξετάστηκαν. Επιπλέον, επιβεβαιώθηκε η επιτυχής έκφραση του γονιδίου *SP/hrpZ_{Psph}*. Αξίζει να σημειωθεί, ωστόσο, ότι τα φυτά που εξετάστηκαν χαρακτηρίζονταν από διαφορετικά επίπεδα έκφρασης του διαγονιδίου, γεγονός που οφείλεται στο ότι οι T_3 σειρές συνιστούν απογόνους αυτογονιμοποίησης διαφορετικών συμβάντων μετασχηματισμού. Οι διαφορές στο επίπεδο των παραγόμενων μεταγραφημάτων, υπογραμμίζουν το γεγονός ότι οι T_3 σειρές παρουσιάζουν διαφορές που πιθανώς αντανακλώνται και σε διαφορετικά επίπεδα ανθεκτικότητας.

Παράλληλα, διερευνήθηκε εάν η ενδογενής παραγωγή της *SP/HrpZ_{Psph}* επάγει αμυντικούς μηχανισμούς, μέσω της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών, με τη χρήση αντιδράσεων ημιποσοτικής RT-PCR. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε RNA που απομονώθηκε από φύλλα διαγονιδιακών φυτών και φυτών αγρίου τύπου. Προς την κατεύθυνση αυτή, μελετήθηκε η πιθανή επαγωγή της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με βιοχημικά μονοπάτια άμυνας των φυτών, όπως αυτά των ενεργών μορφών οξυγόνου (active oxygen species, AOS-), του ιασμονικού οξέος (jasmonic acid, JA-), του σαλικυλικού οξέος (salicylate, SA-) και των πρωτεϊνών παθογένειας (PR-dependent defense pathways). Ειδικότερα, μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων *hin1*, *SIPK*, *WIPK* και *hsr203J*, τα οποία σχετίζονται με την αντίδραση υπερευαισθησίας (Hypersensitive response, HR), καθώς και των γονιδίων *AOX*, *CoII*, *NPRI* και *PR1a*, τα οποία εμπλέκονται στη σύνθεση ενεργών μορφών οξυγόνου (AOS), ιασμονικού οξέος (JA), σαλικυλικού οξέος (SA) και πρωτεϊνών παθογένεσης (PR), αντίστοιχα (Gopalan et al., 1996; Ryals et al., 1996; Gaudriault et al., 1998; Rairdan et al., 2001; Ren et al., 2002; Spoel et al., 2003). Προκειμένου να αποκλειστεί το ενδεχόμενο επιμόλυνσης με γονιδιωματικό DNA, χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας το δομικά εκφραζόμενο γονίδιο *EF1a*. Το μέγεθος του προϊόντος ενίσχυσης του γονιδίου *EF1a* κατέδειξε την απουσία ιντρονίου και συνεπώς, επιμόλυνσης με γονιδιωματικό DNA.

Παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι ορισμένα από τα υπό μελέτη γονίδια παρουσίασαν παρόμοια επίπεδα έκφρασης στα διαγονιδιακά φυτά και στα φυτά-μάρτυρες ενώ σε άλλες περιπτώσεις, τα διαγονιδιακά φυτά παρουσίασαν σαφώς υψηλότερα επίπεδα γονιδιακής

έκφρασης, καταδεικνύοντας τη σύνθετη επίδραση της ενδογενούς παραγωγής χαρπινών στα φυτά. Συγκεκριμένα, η έκφραση των γονιδίων *hsr203j*, *SIPK*, *WIPK*, που εμπλέκονται στο μονοπάτι επαγωγής της αντίδρασης υπερευαισθησίας (Hypersensitive response, HR), κυμάνθηκε σε παρόμοια επίπεδα στα αγρίου τύπου φυτά και σε αυτά που εκφράζουν την πρωτεΐνη SP/HrpZ_{P_{sph}}. Ανάλογα επίπεδα όμοιας γονιδιακής έκφρασης παρατηρήθηκαν επίσης για το γονίδιο *NPRI* που σχετίζεται με το μονοπάτι βιοσύνθεσης του σαλικυλικού οξέος.

Αντίθετα, σημαντική διαφοροποίηση των επιπέδων έκφρασης, μεταξύ των διαγονιδιακών και των φυτών αγρίου τύπου, σημειώθηκε στα γονίδια *AOX*, *COII*, *PR1a* καθώς και στο γονίδιο *Hin1*, το οποίο σχετίζεται άμεσα με τον κυτταρικό θάνατο υπερευαισθησίας (Hypersensitive cell death, HCD) (Gopalan et al., 1996). Προηγούμενες έρευνες σε διαγονιδιακά φυτά που εκφράζουν το γονίδιο *SP/hrpZ_{P_{sph}}* αποδίδουν τα εμφανώς αυξημένα επίπεδα των μεταγραφημάτων *AOX*, *COII*, *PR1a* και *hin1* στο ότι τα φυτά αυτά πιθανώς βρίσκονται σε μια κατάσταση προηγμένης γενικής άμυνας ("primed state") (Pavli et al., 2012). Στην ενεργοποιημένη αυτή άμυνα αποδίδεται εν μέρει η ικανότητα των φυτών να αποκρίνονται άμεσα και αποτελεσματικά έναντι βιοτικών ή/και αβιοτικών καταπονήσεων (Conrath et al., 2006).

Αναφορικά με το γονίδιο *Hin1*, η παρουσία του έχει επιβεβαιωθεί σε πληθώρα φυτών. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι στο φυτό - μοντέλο αραβίδωση περιέχεται μια οικογένεια γονιδίων, *NDRI/Hin1-like*, που εντοπίζονται σε όλο το γονιδιώμα του (Dörmann et al, 2000). Τα γονίδια αυτά είναι τοποθετημένα σε γονιδιακές ομάδες σε διαφορετικά χρωμοσώματα και παρουσιάζουν ομοιότητες με το γονίδιο *Hin1* (harpin-induced) που συναντάται στον καπνό (*Nicotiana tabacum*) (Gopalan et al., 1996). Η δράση του γονιδίου *Hin1* έχει ερευνηθεί εκτενώς. Ειδικότερα, δρα ως μάρτυρας κατά την πρόκληση της αντίδρασης υπερευαισθησίας (Hypersensitive response, HR) (Gopalan et al., 1996). Επίσης, οι Takahashi et al. (2004) αναφέρουν ότι σε φυτά καπνού (*Nicotiana tabacum*) παρατηρήθηκε υπερέκφραση του εν λόγω γονιδίου κατά τη διάρκεια των σταδίων της γήρανσης των φύλλων και των ανθέων, γεγονός που υποδεικνύει ότι πέραν της εμπλοκής του στην αντίδραση υπερευαισθησίας (Hypersensitive response, HR), εμπλέκεται και στη διαδικασία της γήρανσης φυτικών οργάνων. Η ίδια έρευνα αναφέρει ακόμη ότι το γονίδιο *Hin1* ενεργοποιείται παρουσία σπερμινών (ενώσεις που ανήκουν στις πολυαμίνες και επάγουν την ανάπτυξη των φυτών, καθώς και την απόκρισή τους έναντι βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης) και

ότι η ενεργοποίηση αυτή δεν εξαρτάται από το βιοχημικό μονοπάτι βιοσύνθεσης του σαλικυλικού οξέος.

Επιπρόσθετα, σε διαγονιδιακά φυτά καπνού (*Nicotiana tabacum*) που εκφράζουν τη χαρπίνη Hrp_{P_{sph}}, οι Lee et al. (2001) βρέθηκε ότι υπάρχουν περιοχές εντός της πρωτεΐνης που δεν έχουν την ικανότητα επαγωγής της αντίδρασης υπερευαισθησίας (Hypersensitive response, HR), καθώς και ότι υπάρχει στενή συσχέτιση μεταξύ της ικανότητας της συγκεκριμένης πρωτεΐνης να προκαλεί συσσώρευση των μεταγραφημάτων του γονιδίου *Hin1*, ανεξαρτήτου εξωκυτταρικής συσσώρευσης ασβεστίου, και της ικανότητας πρόσδεσης της πρωτεΐνης Hrp_{P_{sph}} στο σημείο πρόσδεσής της. Αντίθετα σε άλλη έρευνα (Li et al., 2012) που αφορά φυτά του είδους *Nicotiana benthamiana* τα οποία μολύνθηκαν με το βακτήριο *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, διαπιστώθηκε έκφραση του γονιδίου *Hin1* λίγες ώρες μετά τη μόλυνση και πριν γίνει μακροσκοπικά ορατή η νέκρωση του φυτικού ιστού, γεγονός που υποδεικνύει ότι το συγκεκριμένο γονίδιο σχετίζεται με την ανθεκτικότητα των φυτών μη ξενιστών. Τέλος, σε πρόσφατη έρευνα (Zhang et al., 2016) στο γονίδιο *Hin1* αποδόθηκε ρόλος ως δείκτη της αντίδρασης υπερευαισθησίας (Hypersensitive Response, HR). Συγκεκριμένα, βρέθηκε πως σε διαγονιδιακά φυτά βαμβακιού του είδους *Gossypium barbadense*, στα οποία είχε ενσωματωθεί η χαρπίνη Hcm1, η έκφραση του γονιδίου *Hin1* ενεργοποιήθηκε έπειτα από μόλυνση με τους μύκητες *Verticillium dahliae* και *Fusarium oxysporum*, και μάλιστα παρατηρήθηκε μικρής έκτασης αντίδραση υπερευαισθησίας ((Hypersensitive response, HR) έπειτα από τη μόλυνση με το μύκητα *Verticillium dahliae*.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το γονίδιο *PR1* (Pathogen-Related 1) δρα ως δείκτης επαγωγής της διασυστηματικής επίκτητης ανθεκτικότητας (Systemic acquired resistance, SAR), και μάλιστα σε φυτά καπνού έχει ταυτοποιηθεί η ύπαρξη τουλάχιστον εννιά ομάδων – δεικτών της εν λόγω ανθεκτικότητας, που περιλαμβάνουν και το γονίδιο *PR1a* (Ryals et al., 1996). Επίσης σε άλλη έρευνα (Zhang et al., 2010), σε φυτά του είδους *Malus hupehensis* βρέθηκαν διάφορα γονίδια *PR*, μεταξύ των οποίων και το γονίδιο *PR1*, τα οποία θεωρούνται ως γονίδια-δείκτες της διασυστηματικής επίκτητης ανθεκτικότητας για το συγκεκριμένο φυτικό είδος, και ότι πιθανόν το γονίδιο αυτό παρουσιάζει διαφορετική έκφραση με βάση τα φυτικά είδη, όπως για παράδειγμα αυτά της αραβίδωσης, του καπνού και του ρυζιού. Ακόμη, σε φυτά αραβίδωσης βρέθηκε πως (Conrath et al., 2006) η επαγωγή της διασυστηματικής επίκτητης ανθεκτικότητας μετά από μόλυνση με αμολυσματικό στέλεχος του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC3000) δεν σχετίζεται μόνο με την άμεση ενεργοποίηση των γονιδίων

τύπου PR, αλλά και με την επαγωγή γενικής άμυνας στους φυτικούς ιστούς, ώστε να καταστεί δυνατή η πιθανή ενεργοποίηση γονιδίων άμυνας, όπως του *PR-1*.

Υπάρχουν ωστόσο και μελέτες (Varet et al., 2003) που υποστηρίζουν πως το γονίδιο *PR1* δεν σχετίζεται με την πρόκληση ανθεκτικότητας στα φυτά (μέσω της εμφάνισης της αντίδρασης υπερευαισθησίας) έναντι του παθογόνου βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC3000), διότι αν και παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα ανθεκτικότητας, δεν εκφράστηκε το υπό μελέτη γονίδιο. Επίσης, σε άλλη έρευνα στην οποία μελετήθηκαν ενός έτους φυτά μηλιάς (*Malus × domestica* cv. Gala), διαπιστώθηκε πως δεν υπήρξε έκφραση του γονιδίου *PR1a* μετά από μόλυνση με τα παθογόνα βακτήρια *E. amylovora* και *P. syringae* pv. *tomato*, υποδεικνύοντας ότι το γονίδιο *PR1a* δεν εμπλέκεται στην επαγωγή ανθεκτικότητας για τα συγκεκριμένα φυτά (Bonasera et al., 2006).

Η δράση των γονιδίων *PR1*, καθώς και *PR1a* στο γενικότερο μηχανισμό άμυνας των φυτών, έχει αποτελέσει αντικείμενο αρκετών ερευνών. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι σε μελέτη των Lee et al. (2001), κύτταρα καπνού (*Nicotiana tabacum*) που είχαν υποστεί καλλιέργεια και περιείχαν τη χαρπίνη H_{P_{sph}}, είχαν ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση μεταγραφημάτων του γονιδίου *PR1*. Το γονίδιο *PR1* βρέθηκε ως σχετιζόμενο με την αύξηση της ανθεκτικότητας έναντι παθογόνων οργανισμών μέσω της αύξησης των επιπέδων ενδογενούς σαλικυλικού οξέος. Ειδικότερα, σε φυτά καπνού που είχαν υποστεί μεταχείριση με την ουσία Rose Bengal (RB), η οποία λειτουργεί ως διεγέρτης των ενεργών ριζών οξυγόνου (active oxygen species), παρατηρήθηκε ενεργοποίηση της βιοσύνθεσης σαλικυλικού οξέος, συσσώρευση μεταγραφημάτων του γονιδίου *PR1a* και αυξημένη ανθεκτικότητα στον ιό του μωσαϊκού του καπνού (*Tobacco mosaic virus*, TMV) μέσω της διασυστηματικής επίκτητης ανθεκτικότητας (Enyedi, 1999). Σε πρόσφατη έρευνα, όπου μελετήθηκαν διαγονιδιακά φυτά βαμβακιού (*Gossypium hirsutum*) που περιείχαν τη χαρπίνη Hcm1, παρατηρήθηκε υπερ-έκφραση του γονιδίου *GhPR1* έπειτα από τεχνητή μόλυνση με το μύκητα *V. dahliae*, υποδεικνύοντας την ενεργοποίηση των βιοχημικών μονοπατιών του σαλικυλικού οξέος και του μονοξειδίου του αζώτου (NO) (Zhang et al., 2016). Επιπρόσθετα, το παραπάνω γεγονός οδήγησε στη δημιουργία μιας κατάστασης γενικότερης άμυνας για τα υπό μελέτη φυτά, και κατά συνέπεια ήταν δυνατή η προστασία τους έναντι παθογόνων μικροοργανισμών. Σε άλλη μελέτη που αφορούσε τη συσχέτιση του σαλικυλικού οξέος με το γονίδιο - δείκτη *PR1*, παρατηρήθηκε ότι η μεταχείριση φυτών αραβίδωσης με σαλικυλικό οξύ σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, είχε ως αποτέλεσμα μειωμένη απόκριση στην επακόλουθη μεταχείριση με

όζον για άλλα αντίστοιχα γονίδια – δείκτες, εκτός από τα *PR1* και *PR2* (Xu and Brosché, 2014).

Πέραν της στενής σχέσης της δράσης του γονιδίου *PR1* με το βιοχημικό μονοπάτι του σαλικυλικού οξέος, υπάρχουν πρόσφατες έρευνες που αναφέρουν συσχέτιση του εν λόγω γονιδίου και με άλλα βιοχημικά μονοπάτια. Χαρακτηριστικά αναφέρεται πως η έρευνα των Nahar et al. (2011) οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η εξωγενής εφαρμογή ιασμονικού οξέος και αιθυλενίου στις ρίζες φυτών ρυζιού (*Oryza sativa*) οδηγεί σε ισχυρή άμυνα των φυτών έναντι των κομβωδών νηματωδών, λόγω της έκφρασης των γονιδίων *OsPR1a* και *OsPR1b*. Επίσης, παρατηρήθηκε υπερ-έκφραση του γονιδίου *OsPR1a* στις ρίζες των φυτών έπειτα από εφαρμογή των παραπάνω ορμονών στα φύλλα. Ακόμη, οι Dong et al. (2005) αναφέρουν ότι σε διαγονιδιακά φυτά αραβίδωσης (*ABA-insensitive*) που περιείχαν τη χαρπίνη HrpN, τα οποία αναπτύσσονταν υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης, η μόλυνση με το βακτήριο *P. syringae* pv. *tomato* είχε ως αποτέλεσμα την έκφραση του γονιδίου *PR-1*.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί το γονίδιο *AOX* εμπλέκεται στη σύνθεση ενεργών μορφών οξυγόνου (AOS, active oxygen species), προσδίδοντας ανθεκτικότητα έναντι φυτοπαθογόνων οργανισμών καθώς και αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα των παραπάνω, αποτελούν η πρόκληση ανθεκτικότητας σε διαγονιδιακά και φυτά αγρίου τύπου καπνού έναντι του ιού του μωσαϊκού του καπνού (*Tobacco mosaic virus*, TMV) (Chivasa and Carr, 1998), η ενεργοποίηση των γονιδίων *AOX* σε φυτά ρυζιού υπό την επίδραση χαμηλών θερμοκρασιών, ξηρασίας και αυξημένων επιπέδων αλατότητας (Ohtsu et al., 2002), καθώς και η έκφραση του γονιδίου *Aox1* σε φυτά του είδους *Medicago truncatula* έπειτα από έκθεση σε διάφορα επίπεδα αλατότητας (Mhadhbi, et al., 2013).

Έχει βρεθεί πως τα *AOX* γονίδια κωδικοποιούνται από μια οικογένεια πολυγονιδίων που εντοπίζεται στον πυρήνα το κυττάρου, η οποία με τη σειρά της ταξινομείται σε δύο μικρότερες οικογένειες, την *Aox1* (συναντάται στα μονοκότυλα φυτά) και την *Aox2* (Polidoros et al., 2009). Ειδικότερα στην περίπτωση του φυτού αραβίδωσης, τα γονίδια *AOX* κατανέμονται στα τρία από τα πέντε συνολικά χρωμοσώματα, γεγονός που υποδεικνύει συμβάντα πολυπλοειδίας που είχαν ως αποτέλεσμα μεταξύ άλλων και την εμφάνιση περισσότερων αλληλομόρφων γονιδίων.

Επιπρόσθετα, η έκφραση των γονιδίων *AOX* ενδέχεται να παρουσιάζει διαφοροποιήσεις ανάλογα με τα φυτικά είδη, τα φυτικά όργανα, καθώς και τα στάδια ανάπτυξης των φυτών.

Συγκεκριμένα, η έκφραση των γονιδίων της οικογένειας *Aox1* επάγεται μετά από έκθεση των φυτών σε καταπνήσεις, ενώ αντίθετα τα γονίδια της οικογένειας *Aox2* εκφράζονται κατά τη διάρκεια καθορισμένων σταδίων ανάπτυξης των φυτών, όπως για παράδειγμα το στάδιο πρώιμης βλάστησης του σπόρου και το στάδιο ωρίμανσης του περικαρπίου των ψυχανθών (Clifton et al., 2006; Polidoros et al., 2009). Θα πρέπει να αναφερθεί πως τα γονίδια *AOX* εμπλέκονται κατά την παραγωγή σημάτων μέσω των μιτοχονδρίων έπειτα από έκθεση σε κάποιου είδους καταπνίση. Στα πλαίσια αυτά, φυτά αραβίδου που είχαν υποστεί μεταχείριση με τη χαρπίνη που προέρχεται από το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, παρουσίασαν έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με πρωτεΐνες των μιτοχονδρίων, καθώς και ενεργοποίηση μιτοχονδριακών ενζύμων, υποδεικνύοντας ότι ο κυτταρικός θάνατος που προκαλείται από τις χαρπίνες, βασίζεται σε λειτουργίες που πραγματοποιούνται στα μιτοχόνδρια (Livaja, 2005, pp. 64,65). Επίσης, σε έρευνα (Cvetkovska, 2012, pg. 115, 118) σε φυτά καπνού (*Nicotiana tabacum*) βρέθηκε πως η εμφάνιση της αντίδρασης υπερευαισθησίας και των αυξημένων επιπέδων οξυγόνου στα μιτοχόνδρια, ήταν πιο αργή στα διαγονιδιακά φυτά στα οποία είχε σιγηθεί η *AOX* (Alternative oxidase, *AOX*).

Ακόμη, υπάρχει η άποψη πως τα γονίδια *AOX* μπορούν να χρησιμεύσουν ως δείκτες της ενεργοποίησης προγραμματισμού των κυττάρων (cell reprogramming initiation) και του τρόπου ανάπτυξης των φυτών υπό συνθήκες καταπνίσης, εξαιτίας της σύνδεσης της δραστηριότητας της εναλλακτικής οξειδάσης και της διαφοροποίησης της ανάπτυξης των φυτών, αλλά και του πολυμορφισμού των νουκλεοτιδίων που παρατηρείται στα γονίδια *AOX* (Arnholdt-Schmitt, et al., 2006).

Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί πως η σύνθεση ενεργών μορφών οξυγόνου δεν συνδέεται πάντα από επαγωγή της αντίδρασης υπερευαισθησίας (Hypersensitive response, *HR*), μιας και αυτό διαφέρει ανάλογα με τους εκάστοτε συνδυασμούς φυτών-παθογόνων οργανισμών (Heath, 2000). Συγκεκριμένα μελέτη των Ordog et al. (2002) υποστηρίζει ότι η έκφραση της πρωτεΐνης *AOX*, αν και παίζει ρόλο στην πρόκληση της αντίδρασης υπερευαισθησίας (Hypersensitive response, *HR*), δεν συνοδεύεται από επαγωγή της ανθεκτικότητας έναντι βιοτικών παραγόντων καταπνίσης, αλλά ενδέχεται να λειτουργεί ως καταστολέας του κυτταρικού θανάτου. Επίσης, σε φυτά κριθαριού, αναφέρεται πως αν και ανιχνεύονται ενεργές ρίζες οξυγόνου, δεν αποτελούν προαπαιτούμενο ενεργοποίησης της αντίδρασης υπερευαισθησίας (Hückelhoven and Kogel, 1998).

Η παρουσία και η δράση του γονιδίου *CoII* έχει ερευνηθεί εκτενώς σε διάφορα φυτά, και έχει προκύψει το συμπέρασμα ότι το εν λόγω γονίδιο εμπλέκεται στο βιοχημικό μονοπάτι του ιασμονικού οξέος, προσδίδοντας κατά συνέπεια ανθεκτικότητα έναντι διάφορων παθογόνων οργανισμών. Ωστόσο, πέραν την προκαλούμενης ανθεκτικότητας, το γονίδιο *CoII* σχετίζεται και με ποικίλες άλλες διεργασίες των φυτών. Χαρακτηριστικά, οι Xie et al. (1998), αναφέρουν ότι σε φυτά αραβίδωσης το γονίδιο *CoII* είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη της γύρης, αλλά συνδέεται με τη μη γονιμότητα των αρσενικών ανθέων. Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη COII έχει βρεθεί ότι δρα ως υποδοχέας στο βιοχημικό μονοπάτι ιασμονικού οξέος-ισολευκίνης, το οποίο εκτός από τα φύλλα είναι πιθανό να απαντάται και σε άλλα όργανα των φυτών, όπως για παράδειγμα τα άνθη, όπου και είναι απαραίτητο για διεργασίες όπως η επιμήκυνση και διάρρηξη των ανθών και η βιωσιμότητα της γύρης (Gfeller et al., 2010). Μάλιστα, το βιοχημικό μονοπάτι ιασμονικού οξέος-ισολευκίνης καθορίζει τη σύνδεση της εν λόγω πρωτεΐνης με άλλες πρωτεΐνες τύπου JAZ (jasmonate ZIM domain), οι οποίες καταστέλλουν τη μεταγραφή γονιδίων που ενεργοποιούνται από το ιασμονικό οξύ (Katsir et al., 2008). Ακόμη, η πρωτεΐνη GmCOII, που προέρχεται από τη σόγια, όταν εκφράστηκε σε φυτά αραβίδωσης, είχε ως αποτέλεσμα αφενός την αποκατάσταση της γονιμότητας και αφετέρου την επαναφορά της άμυνας των φυτών που οφείλεται στο ιασμονικό οξύ (Wang et al., 2005).

Υπάρχουν διάφορες μελέτες που εξετάζουν τη δράση του γονιδίου *CoII* και τη σύνδεσή του με άλλα βιοχημικά μονοπάτια άμυνας των φυτών έναντι ποικίλων βιοτικών παραγόντων καταπόνησης, συμπεριλαμβανομένων των εντομολογικών προσβολών. Ειδικότερα, οι Makandar et al. (2010) αναφέρουν ότι υπάρχει εμπλοκή του σαλικυλικού οξέος στο βιοχημικό μονοπάτι του ιασμονικού οξέος και ότι αυτό μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία ευαίσθητων φυτών, εξαιτίας της ενεργοποίησης γονιδίων μεταξύ των οποίων και το *CoII*. Κατ' αναλογία, οι Kloeck et al. (2001) αναφέρουν ότι η παρατηρηθείσα ανθεκτικότητα φυτών αραβίδωσης, που φέρουν τη μετάλλαξη *col-20*, έναντι του βακτηρίου *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, είναι άμεσα συνυφασμένη με την επαγωγή των γονιδίων τύπου *PR-1* και ότι τα εν λόγω φυτά εμφανίζουν υψηλά επίπεδα σαλικυλικού οξέος έπειτα από τη μόλυνση με το βακτήριο. Τέλος, σε φυτά ρυζιού βρέθηκε πως η σίγαση (silencing) του γονιδίου *OsCoII* είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ευπάθειας των φυτών έναντι του εντόμου *Cnaphalocrocis medinalis*, αποδεικνύοντας ότι το υπό μελέτη γονίδιο αποτελεί απαραίτητο συστατικό του σηματοδοτικού μονοπατιού του ιασμονικού οξέος, και ότι είναι αναγκαίο για την επαγωγή

των TrypPI (trypsin protease inhibitor), PPO (polyphenol oxidase) και POD (peroxidase) έπειτα από προσβολή από το παραπάνω έντομο (Ye et al., 2012).

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της διαγονιδιακής έκφρασης του γονιδίου *SP/hrpZ_{P_{sph}}* στην απόκριση των φυτών T₃ γενιάς που έχουν υποστεί καταπόνηση από βιοτικούς παράγοντες, πραγματοποιήθηκε τεχνητή μόλυνση με το βακτήριο *P. syringae* pv. *tomato* (στέλεχος DC3000) καθώς και τον ιό του μωσαϊκού του καπνού (*Tobacco mosaic virus*, TMV). Η απόκριση των διαγονιδιακών φυτών αξιολογήθηκε τόσο σε φαινοτυπικό επίπεδο, με μακροσκοπικές παρατηρήσεις, όσο και με μεθόδους ποσοτικοποίησης του παθογόνου.

Τα πειράματα καταπονήσεων με τον ιό του μωσαϊκού του καπνού (*Tobacco mosaic virus*, TMV) υποδεικνύουν ότι τα διαγονιδιακά φυτά παρουσίασαν μικρή διαφοροποίηση τόσο στην εκδήλωση συμπτωμάτων, όσο και στο περιεχόμενο ιικό φορτίο συγκριτικά με τα φυτά αγρίου τύπου. Σε επίπεδο συμπτωματολογίας, η διαφοροποίηση αφορούσε σε καθυστερημένη ανάπτυξη συμπτωμάτων και σε ηπιότερη εκδήλωση αυτών, συγκριτικά με τα φυτά αγρίου τύπου. Το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκαν συμπτώματα τοπικής νέκρωσης, που οφείλονται σε πιθανή ενεργοποίηση της αντίδρασης υπερευαισθησίας, πιθανώς οφείλεται στη συσσώρευση της χαρπίνης σε μη επαρκή επίπεδα για να προκαλέσει αντίδραση υπερευαισθησίας (Hypersensitive response, HR) (Tampakaki and Panopoulos, 2000). Σε συμφωνία με τις μακροσκοπικές παρατηρήσεις, τα διαγονιδιακά φυτά παρουσίασαν χαμηλότερο ιικό φορτίο, συγκριτικά με τα φυτά αγρίου τύπου που αξιοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες, τόσο στις 10 ημέρες όσο και στις 20 ημέρες μετά τη μόλυνση με τον ιό.

Στο σύνολό τους, τα προκαταρκτικά πειράματα υποδεικνύουν ότι η έκφραση της χαρπίνης *SP/HrpZ_{P_{sph}}* στα διαγονιδιακά φυτά πιθανώς ευθύνεται για την παρατηρηθείσα καθυστέρηση και ηπιότερη ανάπτυξη συμπτωμάτων της ασθένειας καθώς και τη μειωμένη συσσώρευση του ιού. Ωστόσο, η εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων απαιτεί την αξιολόγηση σαφώς μεγαλύτερου αριθμού φυτών, και την ακριβή συσχέτιση του ιικού τους φορτίου με τη συμπτωματολογία της ασθένειας.

Αναφορικά με την αξιολόγηση της ανθεκτικότητας στην ασθένεια της βακτηριακής κηλίδωσης, η φαινοτυπική αξιολόγηση της συμπτωματολογίας των μολυσμένων φυτών κατέδειξε την ύπαρξη διαφορών στην απόκριση των διαγονιδιακών φυτών συγκριτικά με τα φυτά αγρίου τύπου. Ειδικότερα, η ανάπτυξη συμπτωμάτων στα διαγονιδιακά φυτά υπήρξε περισσότερο ήπια συγκριτικά με τα φυτά αγρίου τύπου ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις, τα

φυτά αυτά εμφάνισαν νεκρωτικές κηλίδες στα φύλλα που δέχθηκαν τον εμβολιασμό. Οι κηλίδες αυτές ενδεχομένως προκύπτουν ως αποτέλεσμα πρόκλησης της αντίδρασης υπερευαισθησίας (Hypersensitive response, HR) η οποία θα είχε ως αποτέλεσμα την αδυναμία επέκτασης του παθογόνου στο ανώτερο τμήμα του φυτού. Προς την κατεύθυνση αυτή, σχετικά είναι τα ευρήματα ότι η μόλυνση φυτών καπνού με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Pst DC3000) έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή γονιδίων που εμπλέκονται στο βιοχημικό μονοπάτι βιοσύνθεσης σαλικυλικού οξέος (Liu et al., 2013). Οι ίδιοι συγγραφείς αναφέρουν ότι η αυξημένη συσσώρευση σαλικυλικού οξέος δύναται να οδηγήσει σε πρόκληση της αντίδρασης υπερευαισθησίας, χωρίς την απαραίτητη συσσώρευση ενεργών μορφών οξυγόνου. Στο σύνολό τους, τα αποτελέσματα της μελέτης υποδεικνύουν ότι η απόκριση των φυτών καπνού στην μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 σχετίζεται περισσότερο με το σηματοδοτικό μονοπάτι του SA ενώ παράλληλα, το αντίστοιχο μονοπάτι του JA πιθανώς παρεμποδίζει τη συσσώρευση SA και την επακόλουθη επαγωγή της HR.

Εναλλακτικά, η παρατηρηθείσα νέκρωση μπορεί να αποδίδεται στη συσσώρευση της χαρπίνης εξωκυτταρικά, η οποία στο παρελθόν έχει σχετιστεί με μια κατάσταση προηγμένης γενικής άμυνας ("primed state") στα διαγονιδιακά φυτά που εκράζουν τη χαρπίνη SP/HrpZ_{P_{sph}}. Ανάλογα συμπτώματα εντοπισμένης νέκρωσης έχουν στο παρελθόν παρατηρηθεί σε SP/HrpZ_{P_{sph}} – διαγονιδιακά φυτά τα οποία χαρακτηρίζονταν από υψηλή ανθεκτικότητα ή/και ανοσία έναντι του ιού της ριζομανίας των ζαχαροτεύτλων (Pavli et al., 2011). Η νέκρωση αυτή υπήρξε εντοπισμένη στη μολυσμένη με τον ιό φυλλική επιφάνεια των ανθεκτικών φυτών (3-4 ημέρες μετά τη μόλυνση με τον ιό). Μάλιστα είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι συμπτώματα νέκρωσης απουσίαζαν από τα μολυσμένα με τον ιό της ριζομανίας διαγονιδιακά φυτά που εκφράζουν την πρωτεΐνη ενδοκυτταρικά (HrpZ_{P_{sph}}), τα οποία παράλληλα χαρακτηρίζονταν από φαινότυπο ανθεκτικότητας ανάλογο με αυτό των φυτών αγρίου τύπου. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, η νέκρωση δεν οφείλονταν σε μια επαγόμενη από τη χαρπίνη αντίδραση υπερευαισθησίας (Hypersensitive response, HR), αλλά πιθανότατα υπήρξε το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του ιού της ριζομανίας με βιοχημικά μονοπάτια άμυνας, που είχαν προηγουμένως ενεργοποιηθεί από την έκφραση της χαρπίνης. Αυτή η υπόθεση συνάδει με τα αποτελέσματα από τη μελέτη των Peng et al. (2004), στην οποία αναφέρεται ότι η παροδική έκφραση της χαρπίνης Hrf1, από το *P. oryzae* pv. *oryzae* προσδίδει μη εξειδικευμένη ανθεκτικότητα στο ρύζι, απουσία κυτταρικού θανάτου. Θα πρέπει τέλος να σημειωθεί πως η ύπαρξη και κυρίως η ένταση των νεκρωτικών κηλίδων που

εμφανίζονται, είναι άμεσα συνεδεμένη με την ποσότητα του μολύσματος που δέχονται τα υπό μελέτη φυτά, αν και τα χαμηλά επίπεδα μολύσματος εξυπηρετούν στην ευκολότερη διαφοροποίηση των συμβατών και ασυμβίβαστων αλληλεπιδράσεων (Wei et al., 2007).

Τα προκαταρκτικά αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υποδεικνύουν ότι η εξωκυτταρική έκφραση της *SP/HrpZ_{P_{sph}}* αποτελεί μια αποτελεσματική προσέγγιση για την επίτευξη ευρείας ανθεκτικότητας σε ένα φυτό-μοντέλο και επιπλέον, υποδεικνύουν τη δυνατότητα αξιοποίησής της για την επίτευξη ανθεκτικότητας σε καλλιεργούμενα είδη που συνιστούν φυσικούς ξενιστές παθογόνων μικροοργανισμών.

Παράλληλα, η ενδογενής παραγωγή της χαρπίνης *SP/HrpZ_{P_{sph}}* οδήγησε σε αυξημένη ανάπτυξη και ευρωστία. Η προώθηση της αύξησης λόγω της εξωγενούς εφαρμογής ή ενδογενούς παραγωγής χαρπινών έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία και για προερχόμενες από άλλα βακτήρια χαρπίνες (Jang et al., 2006). Η συνδυασμένη δράση προστασίας έναντι παραγόντων καταπόνησης και αυξημένου ρυθμού ανάπτυξης, λόγω της έκφρασης χαρπίνης, είναι ιδιαίτερος σημαντική σε φυτικά είδη όπου δίνεται έμφαση στη συνολική παραγόμενη βιομάζα.

Στο σύνολό τους, τα ευρήματα αυτά υπογραμμίζουν τη δυνατότητα αξιοποίησης των χαρπινών ως μία εναλλακτική προσέγγιση για τη βελτίωση της ανθεκτικότητας των φυτών, μέσω της χρήσης της γενετικής μηχανικής. Ωστόσο, κρίνεται απαραίτητη η διεξαγωγή πρόσθετων πειραμάτων, που θα περιλαμβάνουν την αξιολόγηση της ανθεκτικότητας σε μεγαλύτερο αριθμό φυτών καθώς και σε πληθώρα διαφορετικών παθογόνων μικροοργανισμών για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων που αφορούν τη δράση του γονιδίου *SP/hrpZ_{P_{sph}}* σε διαγονιδιακά φυτά.

5. Συμπεράσματα

Η μελέτη της επίδρασης της ενδογενούς έκφρασης της χαρπίνης SP/HrpZ_{P_{sph}} σε φυτά του είδους *Nicotiana benthamiana*, έδειξε ότι:

- 1) Τα διαγονιδιακά φυτά χαρακτηρίζονταν από εμφανώς αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης και ευρωστία, γεγονός που συνάδει με τα ευρήματα προηγούμενων ερευνών, όπου αναφέρεται η προώθηση της αύξησης των φυτών, λόγω της εξωγενούς εφαρμογής ή ενδογενούς παραγωγής χαρπινών.
- 2) Το γεγονός ότι τα διαγονιδιακά φυτά που εκφράζουν το γονίδιο SP/hrpZ_{P_{sph}} χαρακτηρίζονται από εμφανώς αυξημένα επίπεδα των μεταγραφημάτων AOX, COII, PR1a και hin1 πιθανώς σχετίζεται με το γεγονός ότι τα φυτά αυτά βρίσκονται με μια κατάσταση προηγμένης γενικής άμυνας. Στην ενεργοποιημένη αυτή άμυνα μπορεί να αποδίδεται η ικανότητα των φυτών να αποκρίνονται άμεσα και αποτελεσματικά έναντι βιοτικών ή/και αβιοτικών καταπονήσεων.
- 3) Τα φυτά αγρίου τύπου, έπειτα από τη μόλυνση με τον ιό του μωσαϊκού του καπνού (*Tobacco mosaic virus*, TMV) παρουσίασαν τυπικά συμπτώματα στα φύλλα, που συνοψίζονται στην εμφάνιση χλώρωσης, μαρασμού και συστροφής των φύλλων, ενώ στη συνέχεια εμφανίστηκαν νεκρωτικές κηλίδες και κύρτωση του στελέχους. Όσον αφορά στα διαγονιδιακά φυτά που εκφράζουν το γονίδιο SP/hrpZ_{P_{sph}}, η μόλυνση με τον ιό του μωσαϊκού του καπνού (*Tobacco mosaic virus*, TMV) είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ήπιας χλώρωσης και συστροφής των κατώτερων φύλλων, συμπτώματα τα οποία αφενός ήταν μικρότερης έκτασης και αφετέρου καταγράφηκαν αργότερα σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου.
- 4) Τα φυτά αγρίου τύπου που υπέστησαν μόλυνση από το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC3000), παρουσίασαν μικρής έκτασης χλωρωτικές κηλίδες στα φύλλα και στη συνέχεια χλώρωση ολόκληρου του ελάσματος των φύλλων και συμπτώματα μαρασμού. Αντίθετα, τα διαγονιδιακά φυτά που εκφράζουν το γονίδιο SP/hrpZ_{P_{sph}}, παρουσίασαν διαφορετική συμπτωματολογική εικόνα σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου, η οποία περιλαμβάνει την ανάπτυξη χλώρωσης και νεκρωτικών κηλίδων στα φύλλα, οι οποίες πιθανώς σχετίζονται με την επαγωγή της αντίδρασης υπερευαισθησίας.

- 5) Η εξωκυτταρική έκφραση της χαρπίνης SP/HrpZ_{Psph} αποτελεί μία υποσχόμενη προσέγγιση για την επίτευξη ευρείας ανθεκτικότητας σε φυτά.

6. Βιβλιογραφία

Ελληνική Βιβλιογραφία

Ζιώγας, Β. και Μαρκόγλου, Α. (2010). *Γεωργική Φαρμακολογία. Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί Δράσης και Χρήσεις των Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων*. 2^η έκδοση, Εκδόσεις Ζιώγας-Μαρκόγλου, Αθήνα. (σελ. 737, 739, 740, 763, 764).

Μανέτας, Ι. (2005). *Φυσιολογία Φυτών*. Εκδόσεις Ίων. Αθήνα. (σελ. 150, 249).

Ταμπακάκη, Α.Π. (1999). *Μοριακή και Βιοχημική Μελέτη Πρωτεϊνών του Εκκριτικού Συστήματος Τύπου III στο Φυτοπαθογόνο Βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* και Διερεύνηση του Ρόλου τους στην Αντίδραση Υπερευαισθησίας των Φυτών*. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Βιολογίας, Ηράκλειο. (σελ. 19, 48, 55, 107, 188).

Τζάμος, Ε. Κ. (2007). *Φυτοπαθολογία*. Εκδόσεις Α. Σταμούλη, Β' Έκδοση, Αθήνα. (σελ. 383-385, 395, 398, 404, 405, 406, 415-416).

Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

Achuo, E. A., Prinsen, E. and Höfte, M. (2006). Influence of drought, salt stress and abscisic acid on the resistance of tomato to *Botrytis cinerea* and *Oidium neolycopersici*. *Plant Pathology* 55, 178–186.

Alfano, J.R. and Collmer, A. (1997). The Type III (Hrp) Secretion Pathway of Plant Pathogenic Bacteria: Trafficking Harpins, Avr Proteins, and Death. *J Bacteriol.* 179, 18, 5655-62.

Arnholdt-Schmitt, B., Costa, J.H. and de Melo, D.F. (2006). AOX – a functional marker for efficient cell reprogramming under stress? *TRENDS in Plant Science* 11, 6, 281-287.

Berg, G., (2009). Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol* 84, 1, 11-18.

- Bhattacharai, K.K., Xie, Q.G., Mantelin, S., Bishnoi, U., Grike, T., Navarre, D. and Kaloshian, I. (2008). Tomato susceptibility to root-knot nematodes requires an intact jasmonic acid signaling pathway. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21, 1205–1214.
- Bogdanove, A. J., Beer, S. V., Bonas, U., Boucher, C. A., Collmer, A., Coplin, D. L., Cornelis, G. R., Huang, H. C., Hutcheson, S. W., Panopoulos, N. J., and Van Gijsegem, F. (1996). Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Mol. Microbiol.* 20, 3, 681-683.
- Bonasera, J., Kim, J.F. and Beer, S. (2006). PR genes of apple: identification and expression in response to elicitors and inoculation with *Erwinia amylovora*. *BMC Plant Biology* 6, 23.
- Bouchez, O., Huard, C., Lorrain, S., Roby, D. and Balague, C. (2007). Ethylene Is One of the Key Elements for Cell Death and Defense Response Control in the Arabidopsis Lesion Mimic Mutant *vad1*. *Plant Physiology* 145, 2, 465–477.
- Büttner, D. and He, S.Y. (2009). Update on Bacterial Type III Secretion, Type III Protein Secretion in Plant Pathogenic Bacteria. *Plant Physiology* 150, 4, 1656–1664.
- Carvalhais, L. C., Dennis, P. G., Badri, D. V., Tyson, G. W., Vivanco, J. M. and Schenk, P. M. (2013). Activation of the Jasmonic Acid Plant Defense Pathway Alters the Composition of Rhizosphere Bacterial Communities. *PLoS ONE* 8, 2, e56457.
- Chen, L., Zhang, S.-J., Zhang, S.-S., Qu, S., Ren, X., Long, J., Yin, Q., Qian, J., Sun, F., Zhang, C., Wang, L., Wu, X., Wu, T., Zhang, Z., Cheng, Z., Hayes, M., Beer, S. V. and Dong, H. (2008). A fragment of the *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* harpin HpaG_{Xoo} reduces disease and increases yield of rice in extensive grower plantings. *Phytopathology* 98, 792-802.
- Chivasa, S. and Carr, J.P. (1998). Cyanide Restores N Gene–Mediated Resistance to Tobacco Mosaic Virus in Transgenic Tobacco Expressing Salicylic Acid Hydroxylase. *The Plant Cell* 10, 1489–1498.
- Clifton, R., Harvey Millar, A. and Whelan, J. (2006). Alternative oxidases in Arabidopsis: A comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating bypasses. *Biochimica et Biophysica Acta* 1757, 730–741.

- Collmer, A., Badel, J. L., Charkowski, A. O., Deng, W.-L., Fouts, D. E., Ramos, A. R., Rehm, A. H., Anderson, D. M., Schneewind, O., van Dijk K. and Alfano, J. R. (2000). *Pseudomonas syringae* Hrp type III secretion system and effector proteins. *PNAS* 97, 16, 8770–8777.
- Conrath, U., Beckers, G.J.M., Flors, V., Garcia-Agustin, P., Jakab, G., Mauch, F., Newman, M.-A., Pieterse, C. M. J., Poinssot, B., Pozo, M. J. Pugin, A., Schaffrath, U., Ton, J., Wendehenne, D., Zimmerli, L. and Mauch-Mani B. (2006). Priming: Getting ready for battle. *Mol Plant Microbe Interact* 19, 1062–1071.
- Cooper, W.R., Jia, L. and Goggin, L. (2005). Effects of jasmonate-induced defenses on root-knot nematode infection of resistant and susceptible tomato cultivars. *J. Chem. Ecol.* 31, 1953–1967.
- Cvetkovska, M. (2012). *The Role of Mitochondrial Alternative Oxidase in Plant-Pathogen Interactions*. PhD thesis. Department of Cell & Systems Biology. University of Toronto (pg. 115, 118).
- De Vleeschauwer, D., Yang, Y., Cruz, C. V. and Höfte, M. (2010). Absciscic Acid-Induced Resistance against the Brown Spot Pathogen *Cochliobolus miyabeanus* in Rice Involves MAP Kinase-Mediated Repression of Ethylene Signaling. *Plant Physiology* 152, 4, 2036–2052.
- De Wit, P.J. (2007). How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cell Mol Life Sci.* 64, 21, 2726-2732.
- Dong, H.-S., Delaney, T.P., Bauer, D.W., and Beer, S.V. (1999). Harpin induces disease resistance in Arabidopsis through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the NIM1 gene. *Plant J.* 20, 207-215.
- Dong, H.P., Peng, J., Bao, Z., Meng, X., Bonasera, J.M., Chen, G., Beer, S.V. and Dong, H. (2004). Downstream divergence of the ethylene signaling pathway for harpin-stimulated Arabidopsis growth and insect defense. *Plant Physiol.* 136, 3, 3628-38.
- Dong, H.P., Yu, H., Bao, Z., Guo, X., Peng, J., Yao, Z., Chen, G., Qu, S. and Dong, H. (2005). The ABI2-dependent abscisic acid signaling controls HrpN-induced drought tolerance in Arabidopsis. *Planta* 221, 313–27.

- Dörmann, P., Gopalan, S., He, S. Y. and Benning, C. (2000). A gene family in *Arabidopsis thaliana* with sequence similarity to *NDRI* and *HIN1*. *Plant Physiol. Biochem.* 38, 789–796.
- Du, J., Rietman, H., Vleeshouwers, V.G.A.A. (2014). Agroinfiltration and PVX Agroinfection in Potato and *Nicotiana benthamiana*. *J. Vis. Exp.* 83, e50971.
- Enyedi, A. J. (1999). Induction of Salicylic Acid Biosynthesis and Systemic Acquired Resistance using the Active Oxygen Species Generator Rose Bengal. *J. Plant Physiol.* 154, 106-112.
- Erhardt, M., Namba, K. and Hughes, K. T. (2010). Bacterial Nanomachines: The Flagellum and Type III Injectisome. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2, 11, a000299.
- Fan, J., Hill, L., Crooks, C., Doerner, P. and Lamb, C. (2009). Absciscic Acid Has a Key Role in Modulating Diverse Plant-Pathogen Interactions. *Plant Physiology* 150, 1750-1761.
- Fan, J.W., Hu, C.L., Zhang, L.N., Li, Z.L., Zhao, F.K. and Wang, S.H. (2014) Jasmonic acid mediates tomato's response to root knot nematodes. *J. Plant Growth Regul.* 34, 196–205.
- Gaudriault, S., Brisset, M.N., and Barny, M.A. (1998). HrpW of *Erwinia amylovora*, a new Hrp-secreted protein. *FEBS Letters* 428, 224-228.
- Gfeller, A., Liechti, R and Farmer, E.E. (2010). Arabidopsis Jasmonate Signaling Pathway. *Sci. Signal.* 3, 109, cm4.
- Gharti-Chhetri, G.B., Cherdshewasart, W., Dewulf, J., Jacobs, M. and Negrutiu, I. (1992). Polyethylene glycol-mediated direct gene transfer in *Nicotiana* spp. *Physiologia Plantarum* 85, 345-351.
- Goodin, M. M., Zaitlin, D., Naidu, R. A. and Lommel, S. A. (2008). *Nicotiana benthamiana*: Its History and Future as a Model for Plant–Pathogen Interactions. *Mol Plant Microbe Interact.* 21, 8, 1015–1026.
- Gopalan, S., Wei, W., and He, S.Y. (1996). *hrp* gene-dependent induction of *hin1*: a plant gene activated rapidly by both harpins and the *avrPto* gene-mediated signal. *Plant Journal* 10, 4, 591-600.

- Hayat, Q., Hayat, S., Irfan, M. and Ahmad, A. (2010) Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environ Exp Bot* 68, 14-25.
- He, S.Y., Huang, H.C., and Collmer, A. (1993). *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpins: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell* 73, 1255-1266.
- Heath, M. C. (2000). Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* 44, 321–334.
- Hoffman, N., (2008). In brief Absciscic Acid–Mediated Suppression of Systemic Acquired Resistance Signaling. *The Plant Cell* 20, 6, 1425.
- Hofius, D., Tsitsigiannis, D. I., Jones, J. D.G. and Mundy, J. (2007). Inducible cell death in plant immunity. *Sem. in Cancer Biology* 17, 166–187.
- Horsch, R., Fry, J., Hoffman, N., Eichholtz, D., Rogers, S. and Fraley, R.T. (1985a). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227, 1229-1231.
- Horsch, R.B., Rogers, S.G. and Fraley, R.T. (1985b). Transgenic plants. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 50, 433-437.
- Hoyos, M.E., Stanley, C.M., He, S.Y., Pike, S., Pu, X-A and Novacky, A. (1996). The Interaction of HarpinPss with Plant Cell Walls. *Mol Plant Microbe Interact.* 9, 7, 608-616.
- Hückelhoven, R. and Kogel, K.-H. (1998). Tissue-specific superoxide generation at interaction sites in resistant and susceptible near-isogenic barley lines attacked by the powdery mildew fungus (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*). *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11, 292–300.
- Hueck, C.J. (1998). Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62, 2, 379–433.
- Huo, R., Wang, Y., Ma, L.-L., Qiao, J.-Q., Shao, M. and Gao, X-W. (2010) Assessment of inheritance pattern and agronomic performance of transgenic rapeseed having harpin_{Xooc}-encoding *hrf2* gene. *Transgenic Res* 19, 841–847.

- Idrees, M., Naeem, M., Aftab, T., Khan Moinuddin, M. M. A. (2011). Salicylic acid mitigates salinity stress by improving antioxidant defence system and enhances vincristine and vinblastine alkaloids production in periwinkle [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don]. *Acta Physiol Plant* 33, 987–999.
- Jang, Y.-S., Sohn, S.-I., and Wang, M.-H. (2006). The hrpN gene of *Erwinia amylovora* stimulates tobacco growth and enhances resistance to *Botrytis cinerea*. *Planta* 223, 449–456.
- Jones, J. D. G. and Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 16, 323–329.
- Katsir, L., Schillmiller, A. L., Staswick, P.E., He, S.Y. and Howe, G. A. (2008). COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *PNAS* 105, 19, 7100–7105.
- Kim, J.F. and Beer, S.V. (2000). *hrp genes and harpins of Erwinia amylovora: a decade of discovery*. In: Vanneste, J.L. (Ed.) Fire Blight and its Causative Agent, *Erwinia amylovora*. CAB International, UK, Wallingford, pp. 141–162.
- Kim, M., Ahn, J.-W., Jin, U.-H., Choi, D., Paek, K.-H. and Pai, H.-S. (2003). Activation of the Programmed Cell Death Pathway by Inhibition of Proteasome Function in Plants. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 21, 19406–19415.
- Kloek, A. P., Verbsky, M. L., Sharma, S.B., Schoelz, J.E., Vogel, J., Klessig, D.F. and Kunke, B.N. (2001). Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by an *Arabidopsis thaliana* coronatine-insensitive (*coi1*) mutation occurs through two distinct mechanisms. *The Plant Journal* 26, 5, 509–522.
- Lee, J., Klessig, D. F. and Nürnberger, T. (2001). A Harpin Binding Site in Tobacco Plasma Membranes Mediates Activation of the Pathogenesis-Related Gene *HIN1* Independent of Extracellular Calcium but Dependent on Mitogen-Activated Protein Kinase Activity. *The Plant Cell* 13, 1079–1093.
- Lee, J., Klüsener, B., Tsiamis, G., Stevens, C., Neyt, C., Tampakaki, A. P., Panopoulos, N. J., Nöller, J., Weiler, E. W., Cornelis, G. R., Mansfield, J. W. and Nürnberger, T. (2001). HrpZP_{sph} from the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* binds to lipid bilayers and forms an ion-conducting pore in vitro. *PNAS* 98, 1, 289–294.

- Li, J.G., Liu, H.X., Chen, L.F., Gu, C., Allen, C. and Guo, J.-H. (2010). PopW of *Ralstonia solanacearum*, a new two-domain harpin targeting the plant cell wall. *Mol Plant Pathol* 11, 3, 371-381.
- Li, M.C. (2007). *Type III Secretion System of Phytopathogenic Bacterium Pseudomonas syringae: From Gene to Function*. Academic Dissertation. Department of Biological and Environmental Sciences. Division of General Microbiology. Faculty of Biosciences and Graduate School in Biotechnology and Molecular Biology (GSBM) University of Helsinki. (pg. 21, 27, 31)
- Li, R. and Fan, Y. (1999). Reduction of lesion growth rate of blight plant disease in transgenic potato expressing harpin protein. *Sci China C Life Sci.* 42, 1, 96-101.
- Li, W., Xu, Y.-P., Zhang, Z.-X., Cao, W.-Y. Li, F., Zhou, X., Chen, G.-Y., Cai, X.-Z. (2012). Identification of Genes Required for Nonhost Resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Reveals Novel Signaling Components. *PLoS ONE* 7, 8, e42796.
- Livaja M. (2005). *The action of the bacterial effector protein harpin on Arabidopsis thaliana*. Genehmigten Dissertation. Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München. (pg. 64, 65).
- Makandar, R., Nalam, V., Chaturvedi, R., Jeannotte, R., Sparks, A.A. and Shah, J. (2010). Involvement of Salicylate and Jasmonate Signaling Pathways in *Arabidopsis* Interaction with *Fusarium graminearum*. *Mol Plant Microbe Interact.* 23, 7, 861–870.
- Mauch-Mani, B. and Mauch, F. (2005). The role of abscisic acid in plant–pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 8, 409-414.
- Mhadhbi, H., Fotopoulos, V., Mylona, P.V., Moez Jebara, M., Aouani, M.E. and Polidoros, A.N. (2013). Alternative oxidase 1 (*Aox1*) gene expression in roots of *Medicago truncatula* is a genotype-specific component of salt stress tolerance. *Journal of Plant Physiology* 170, 111–114.
- Miao, W., Wang, X., Li, M., Song, C., Wang, Y., Hu, D. and Wang, J. (2010). Genetic transformation of cotton with a harpin-encoding gene *hpaXoo* confers an enhanced defense

response against different pathogens through a priming mechanism. *BMC Plant Biology* 10, 67.

Nahar, K., Kyndt, T., de Vleeschauwer, D., Hofte, M. and Gheysen, G. (2011). The jasmonate pathway is a key player in systemically induced defense against root knot nematodes in rice. *Plant Physiol.* 157, 305–316.

Oh, C.S., and Beer, S.V. (2007). AtHIPM, an Ortholog of the apple HrpN-Interacting Protein, is a negative regulator of plant growth and mediates the growth-enhancing effect of HrpN in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 145: 426-436.

Ohtsu, K., Ito, Y., Saika, H., Nakazono, M., Tsutsumi, N. and Hirai, A. (2002). ABA-Independent Expression of Rice Alternative Oxidase Genes under Environmental Stresses. *Plant Biotechnology* 19, 3, 187 190.

Ordog, S. H., Higgins, V. J. and Vanlerberghe, G. C. (2002). Mitochondrial Alternative Oxidase Is Not a Critical Component of Plant Viral Resistance But May Play a Role in the Hypersensitive Response. *Plant Physiology* 129, 1858–1865.

Ozalvo, R., Cabrera, J., Escobar, C., Christensen, S.A., Borrego, E.J., Kolomiets, M.V., Castresana, C., Iberkleid, I. and Horowitz, S.B. (2014). Two closely related members of *Arabidopsis* 13-lipoxygenases (13-LOXs), LOX3 and LOX4, reveal distinct functions in response to plant-parasitic nematode infection *Mol. Plant Pathol.* 15, 319–332.

Pavli, O.I., Athanasouli, V., Tampakaki, A., and Skarakis, G.N. (2008). Preliminary evaluation of the effect of transgenic harpin expression in plants on resistance to viral diseases. In *12th National Congress in Plant Breeding*. 8-10 October 2008. Naoussa, pp. 271-277.

Pavli, O.I., Kelaidi, G.I., Tampakaki, A.P. and Skaracis, G.N. (2011). The hrpZ Gene of *Pseudomonas syringae* pv.*phaseolicola* Enhances Resistance to Rhizomania Disease in Transgenic *Nicotiana benthamiana* and Sugar Beet. *PLoS ONE* 6, 3.

Pavli OI, Tampakaki AP, Skaracis GN (2012). High Level Resistance against Rhizomania Disease by Simultaneously Integrating Two Distinct Defense Mechanisms. *PLoS ONE* 7, 12, e51414.

- Peng, J.-L., Dong, H.-S., Dong, H.-P., Delaney, T.P., Bonasera, J.M., Beer, S.V. (2003). Harpin-elicited hypersensitive cell death and pathogen resistance requires the NDR1 and EDS1 genes. *Phys Mol Plant Pathol* 62, 317-326.
- Peng, J.-L., Bao, Z.-L., Ren, H.-Y., Wang, J.-S. and Dong, H.-S. (2004). Expression of Harpin_{Xoo} in Transgenic Tobacco Induces Pathogen Defense in the Absence of Hypersensitive Cell Death. *Phytopathology* 94, 10, 1048-1055.
- Polidoros, A.N., Mylona, P.V. and Arnholdt-Schmitt, B. (2009). Aox gene structure, transcript variation and expression in plants. *Physiologia Plantarum* 137, 342–353.
- Pontier, D., Balaguè, C. and Roby, D. (1998). The hypersensitive response. A programmed cell death associated with plant resistance. *C.R.Acad. Sci.Paris. Sciences de la vie* 321, 721-734.
- Portaliou, A. G., Tsolis, K. C., Loos, M. S., Zorzini, V. and Economou, A. (2016). Type III Secretion: Building and Operating a Remarkable Nanomachine. *Trends Biochem Sci* 41, 2, 175-189.
- Rairdan, G.J., Donofrio, N.M., and Delaney, T.P. (2001). Salicylic acid and NIM1/NPR1-independent gene induction by incompatible *Peronospora parasitica* in Arabidopsis. *Mol Plant Microbe Interact* 14, 10, 1235-1246.
- Ren, D., Yang, H., and Zhang, S. (2002). Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in *Arabidopsis*. *J Biological Chemistry* 277, 1, 559-565.
- Ren, H., Gu, G., Long, J., Yin, Q., Wu, T., Song, T., Zhang, S., Chen, Z. and Dong, H. (2006a). Combinative effects of a bacterial type-III effector and a biocontrol bacterium on rice growth and disease resistance. *J Biosci.* 31, 5, 617-627.
- Ren, H., Song, T., Wu, T., Sun, L., Liu, Y., Yang, F., Chen, Z. and Dong, H. (2006b). Effects of a biocontrol bacterium on growth and defence of transgenic rice plants expressing a bacterial type-III effector. *Ann. Microbiol.* 56, 281–287.
- Rivas-San Vicente, M. and Plasencia, J. (2011). Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. Review Paper. *Journal of Experimental Botany* 62, 10, 3321–3338.

- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y., and Hunt, M.D. (1996). Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* 8, 10, 1809-1819.
- Saier, M. H. (2006). Protein Secretion Systems in Gram-Negative Bacteria. *Microbe* 1, 9, 414-419.
- Schreiber, K. and Desveaux, D. (2008). Message in a Bottle: Chemical Biology of Induced Disease Resistance in Plants. *Plant Pathol. J.* 24, 3, 245-268.
- Seo, P.J., and Park, C.M. (2010). MYB96-mediated abscisic acid signals induce pathogen resistance response by promoting salicylic acid biosynthesis in Arabidopsis. *New Phytologist* 186, 471-483.
- Shao, M., Wang, J., Dean, R.A., Lin, Y., Gao, X. and Hu, S. (2008). Expression of a harpin-encoding gene in rice confers durable nonspecific resistance to *Magnaporthe grisea*. *Plant Biotechnol J.* 6,1,73-81.
- Spoel, S.H., Koornneef, A., Claessens, S.M.C., Korzelius, J.P., van Pelt, J.A., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Metraux, J.-P., Brown, R., Kazan, K., van Loon, L.C., Dong, X., and Pieterse, C.M.J. (2003). NPR1 Modulates Cross-Talk between Salicylate- and Jasmonate-Dependent Defense Pathways through a Novel Function in the Cytosol. *Plant Cell* 15, 3, 760-770.
- Strobel, N.E., Ji, C., Gopalan, S., Kuc, J.A., and He, S.Y. (1996). Induction of systemic acquired resistance in cucumber by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 HrpZPss protein. *Plant J.*, 9, 431-439.
- Sun, Y., Cao, H., Yin, J.I.N., Kang, L.E. and Ge, F. (2010). Elevated CO₂ changes the interactions between nematode and tomato genotypes differing in the JA pathway. *Plant, Cell and Environment*, 33, 729-739.
- Takahashi, Y., Berberich, T., Yamashita, K., Uehara, Y., Miyazaki, A., and Kusano, T. (2004). Identification of tobacco *HIN1* and two closely related genes as spermine-responsive genes and their differential expression during the Tobacco mosaic virus-induced hypersensitive response and during leaf- and flower-senescence. *Plant Molecular Biology* 54, 613-622.

- Takamura, Y., Ishida, Y., Inoue, Y., Tsutsumi, F., and Kuwata, S. (2004). Induction of a hypersensitive response-like reaction in transgenic tobacco expressing harpin_{PS}. *Physiol and Mol Plant Pathol* 64, 83-89.
- Tampakaki, A. P. and Panopoulos, N. J. (2000). Elicitation of Hypersensitive Cell Death by Extracellularly Targeted HrpZP_{sph} Produced In Planta, *Mol Plant Microbe Interact.* 13, 12, 1366–1374.
- Tampakaki, A. P., Hatziloukas, E. and Panopoulos, N.J. (2009). Plant Pathogens, Bacterial. Encyclopedia of Microbiology (Moselio Schaechter, Editor), Oxford, Elsevier, pp. 655-677.
- Tampakaki, A.P., Skandalis, N., Gazi, A., Bastaki, M.N., Sarris, P.F., Charova, S.N., Kokkinidis, M. and Panopoulos, N.J. (2010). Playing the “Harp”: Evolution of our Understanding of *hrp/hrc* Genes. *Annu.Rev.Phytopathol.* 48, 347–370.
- Tampakaki, A.P. (2014). Commonalities and differences of T3SSs in rhizobia and plant pathogenic bacteria. *Frontiers in Plant Science* 5, 114.
- Ueki, S., Magori, S., Lacroix, B. and Citovsky V. (2013). Transient Gene Expression in Epidermal Cells of Plant Leaves by Biolistic DNA Delivery. *Methods Mol Biol.* 940, 17–26.
- Varet, A., Hause, B., Hause, G., Scheel, D. and Lee, J. (2003). The Arabidopsis *NHL3* Gene Encodes a Plasma Membrane Protein and Its Overexpression Correlates with Increased Resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Plant Physiology* 132, 2023–2033.
- Wang, Z., Dai, L., Jiang, Z., Peng, W., Zhang, L., Wang, G. and Xie, D. (2005). *GmCOII*, a Soybean F-Box Protein Gene, Shows Ability to Mediate Jasmonate-Regulated Plant Defense and Fertility in *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact.* 18, 12, 1285–1295.
- Wang, X.Y., Song, C.F., Miao, W.G., Ji, Z.L., Wang, X., Zhang, Y., Zhang, J.H., Hu, J.S., Borth, W. and Wang, J.S. (2008). Mutations in the N-terminal coding region of the harpin protein Hpa1 from *Xanthomonas oryzae* cause loss of hypersensitive reaction induction in tobacco. *Appl Microbiol Biotechnol.* 81, 2, 359-369.
- War, A.R., Paulraj, M.G., War, M.Y. and Ignacimuthu, S. (2011). Role of salicylic acid in induction of plant defense system in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Signaling & Behavior* 6, 11, 1787-1792.

- Wei, C.F., Kvitko, B.H., Shimizu, R., Crabill, E., Alfano, J.R., Lin, N.C., Martin, G.B., Huang, H.C. and Collmer, A. (2007). A *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 mutant lacking the type III effector HopQ1-1 is able to cause disease in the model plant *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Journal* 51, 32–46.
- Wei, Z.M., Laby, R.J., Zumoff, C.H., Bauer, D.W., He, S.Y., Collmer, A. and Beer, S.V. (1992). Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science* 257, 85-88.
- Wu, F.-S. and Feng, T.-Y. (1999). Delivery of plasmid DNA into intact plant cells by electroporation of plasmolysed cells. *Plant Cell Reports* 18, 381–386.
- Wu, X., Wu, T., Long, J., Yin, Q., Zhang, Y., Chen, L., Liu, R., Gao, T. and Dong, H. (2007). Productivity and biochemical properties of green tea in response to full-length and functional fragments of HpaG_{Xoo}, a harpin protein from the bacterial rice leaf streak pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *J. Biosci.* 32, 6, 1119-1131.
- Xie, D.- X., Feys, B. F., James, S., Nieto-Rostro, M. and Turner, J.G. (1998). *COI1*: An Arabidopsis Gene Required for Jasmonate-Regulated Defense and Fertility. *Science* 280, 5536, 1091-1094.
- Xu, E. and Brosché, M. (2014). Salicylic acid signaling inhibits apoplastic reactive oxygen species signaling. *BMC Plant Biology* 14, 155.
- Yan, C. and Xie, D. (2015). Jasmonate in plant defence: sentinel or double agent? *Plant Biotechnology Journal* 13, 9, 1233–1240.
- Yasuda, M., Ishikawa, A., Jikumaru, Y., Seki, M., Umezawa, T., Asami, T., Maruyama-Nakashita, A., Kudo, T., Shinozaki, K., Yoshida, S., and Nakashita, H. (2008). Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid– mediated abiotic stress response in Arabidopsis. *Plant Cell* 20, 1678–1692.
- Ye, M., Luo, S.M., Xie, J.F., Li, Y.F., Xu, T., Liu, Y., Song Y.Y., Zhu-Salzman, K., Zeng R S. (2012). Silencing COI1 in Rice Increases Susceptibility to Chewing Insects and Impairs Inducible Defense. *PLoS ONE* 7, 4, e36214.

Zhang, C., Qian, J., Bao, Z. Hong, X. and Dong, H. (2007). The Induction of Absciscic-Acid-Mediated Drought Tolerance is Independent of Ethylene Signaling in Arabidopsis Plants Responding to a Harpin Protein. *Plant Mol Biol Rep* 25, 98–114.

Zhang, J., Du, X., Wang, Q., Chen, X., Lv, D., Xu, K., Qu, S. and Zhang, Z. (2010). Expression of pathogenesis related genes in response to salicylic acid, methyl jasmonate and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in *Malus hupehensis* (Pamp.) Rehd. *BMC Research Notes* 3, 208.

Zhang, Z., Zhao, J., Ding, L., Zou, L., Li, Y., Chen, G. and Zhang, T. (2016). Constitutive expression of a novel antimicrobial protein, Hcm1, confers resistance to both Verticillium and Fusarium wilts in cotton. *Scientific Reports* 6, 20773.

Διαδικτυακή Βιβλιογραφία

<http://www.triachem.com/Products/SeedDressing/Messenger%20ST.pdf>

<http://www.nagref.gr/journals/ethg/images/19/ethg19p6.pdf>

<http://biology.fullerton.edu/msacco/Research.html>